

**PHD ÉRTEKEZÉS**

**A FEJLŐDŐ BÉLIDEGRENDSZER KVALITATÍV ÉS KVANTITATÍV  
ELEMZÉSE**

**ROMÁN VIKTOR**

**TÉMAVEZETŐ:  
DR. FEKETE ÉVA  
HABILITÁLT EGYETEMI DOCENS**

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM  
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR  
ÁLLATTANI ÉS SEJTBOLÓGIAI TANSZÉK**

**SZEGED  
2005**

*Vérköreid, miként a rózsabokrok,  
reszketnek szüntelen.  
Viszik az örök áramot, hogy  
orcádon nyíljon ki a szerelem  
s méhednek áldott gyümölcse legyen.  
Gyomrod érzékeny talaját  
a sok gyökerecske át meg át  
hímezi, finom fonalát  
csomóba szőve, bontva bogját –  
hogy nedűid sejtje gyűjtse sok raját  
s lombos tüdőd szép cserjéi saját  
dicsőségüket susogják!*

*Az örök anyag boldogan halad  
benned a belek alagútjain  
és gazdag életet nyer a salak  
a buzgó vesék forró kútjain!*

*Hullámzó dombok emelkednek,  
csillagképek rezegnek benned,  
tavak mozdulnak, munkálnak gyáarak,  
sűrög millió élő állat,  
bogár,  
hinár,  
a kegyetlenség és jóság;  
nap süt, homályló északi fény borong –  
tartalmaidban ott bolyong  
az öntudatlan örökkévalóság.*

*József Attila: Óda (részlet)*

## TARTALOMJEGYZÉK

A rövidítések magyarázata.....	3
<b>1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....</b>	<b>5</b>
1.1. A bélidegrendszer funkcionális anatómiája.....	5
1.2. A bélidegrendszer embrionális fejlődése.....	8
1.3. A bélidegrendszer ingerületátvivő anyagai.....	10
1.3.1. A nitrerg rendszer.....	11
1.3.2. A glutamáterg rendszer.....	13
1.4. A bélidegrendszeren végzett kvantitatív vizsgálatok rövid áttekintése.....	15
<b>2. CÉLKITŰZÉSEK.....</b>	<b>18</b>
<b>3. ANYAGOK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK.....</b>	<b>20</b>
3.1. Csirke vizsgálati anyag előkészítése.....	20
3.2. Humán vizsgálati anyag előkészítése.....	21
3.3. Paraffinmetszetek készítése.....	22
3.4. NADPH-diaforáz hisztokémiai festés.....	22
3.5. Kuprolin kék hisztokémiai festés.....	22
3.6. Immuncitokémiai festések.....	23
3.7. Mikroszkópos módszerek.....	24
3.8. Statisztikai módszerek.....	25

4. EREDMÉNYEK.....	26
4.1. A bélidegrendszer nitrerg neuronjainak vizsgálata fejlődő csirkeembrióban.....	26
4.2. Az összneuronszám változásai kikelés előtti és frissen kikelt csirkében.....	34
4.3. A fejlődő humán bélidegrendszer glutamáterg rendszerének vizsgálata.....	39
5. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE.....	43
5.1. A bélidegrendszer nitrerg neuronjainak vizsgálata fejlődő csirkeembrióban.....	43
5.2. A teljes neuronszám változásai kikelés előtti és frissen kikelt csirkében.....	47
5.3. A fejlődő humán bélidegrendszer glutamáterg rendszerének vizsgálata.....	51
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	53
6.1. Magyar nyelvű összefoglalás.....	53
6.2. Summary.....	55
7. IRODALMI HIVATKOZÁSOK.....	57
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	68

## A rövidítések magyarázata

ACh	acetil-kolin (acetylcholine)
ANOVA	varianciaanalízis (analysis of variance)
AMCA	7-amino-4-metilkumarin-3-acetát (7-amino-4-methylcumarine-3-acetate)
ATP	adenozin-trifoszfát (adenosine triphosphate)
Bmp4	csont morfogenetikus fehérje (bone morphogenetic protein 4)
Cy3	indokarbocianin (indocarbocyanin)
cGMP	ciklikus guanozin-monofoszfát (cyclic guanosine monophosphate)
CO	szén-monoxid (carbon monoxide)
DAB	diamino-benzidin (diaminobenzidine)
DCC	vastag- és végbélrákban deléciós (deleted in colorectal cancer)
ENS	bélidegrendszer (enteric nervous system)
FITC	fluoreszcein-izotiocianát (fluorescein isothiocyanate)
GABA	gamma-amino-vajsav (gamma aminobutyric acid)
GDNF	glia sejtvonalból származó neurotrophicus faktor (glial cell line derived neurotrophic factor)
GFR $\alpha$ 1	GDNF receptor alfa 1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	hidrogén-peroxid (hydrogen peroxide)
ICC	Cajal-féle interstitialis sejt (interstitial cell of Cajal)
IPAN	helyi elsődleges érző neuron (intrinsic primary afferent neuron)
NADPH	$\beta$ -nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát ( $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
NADPH-d	$\beta$ -nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát-diaforáz ( $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase)

NANC	nem adrenerg, nem kolinerg (non-adrenergic non-cholinergic)
NBT	nitroblue tetrazolium
ncNOS	neuronalis konstitutív nitrogén-monoxid-szintáz (neuronal constitutive nitric oxide synthase)
NF	200 kDa-os neurofilament
NMDA	N-metil-D-aszpartát (N-methyl-D-aspartate)
NO	nitrogén-monoxid (nitric oxide)
NOS	nitrogén-monoxid-szintáz (nitric oxide synthase)
mtsai.	munkatársai
PACAP	hipofizeális adenilát cikláz aktiváló polipeptid (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide)
PB	foszfát puffer (phosphate buffer)
PBS	foszfát pufferes sóoldat (phosphate buffered saline)
PM	plexus myentericus
PS	plexus submucosus
SD	standard deviáció (standard deviation)
SE	standard hiba (standard error)
Shh	sonic hedgehog
VENT	ventrális irányba vándorló velőcsősejtek (ventrally emigrating neural tube cells)
VIP	vazoaktív intestinalis polipeptid (vasoactive intestinal polypeptide)

Az idegen kifejezések az Orvosi helyesírási szótár (Akadémia Kiadó, Bp., 1992) szabályainak megfelelően használtam, az ún. vagylagos írású címszavak esetében általában a magyaros írásmóddal megegyezően.

## **1. Bevezetés és irodalmi áttekintés**

### **1.1. A bélidegrendszer funkcionális anatómiája**

A bélidegrendszer (enteric nervous system, ENS) a teljes tápcsatorna és az epehólyag falában valamint a hasnyálmirigyben található entericus neuronok és gliasejtek komplex hálózatából áll (Furness és Costa 1987). Ezeket az idegsejteket sokáig olyan átkapcsoló neuronoknak gondolták, amelyeken keresztül a nervus vagus vezérli a bél izomzatát és mirigyeit. Annak ellenére tartotta magát ez az elképzelés, hogy már Bayliss és Starling kutyán (Gershon 1998), illetve Trendelenburg tengerimalacon végzett úttörő kísérletei (Gershon 1998) óta ismert volt a bélperisztaltika jelensége, amely a központi idegrendszer és annak környéki kapcsolókészülékeinek hiányában is tökéletesen működik (Furness és mtsai. 1995). Az ENS-t Langley különítette el a környéki idegrendszer másik két divíziójától, a szimpatikus és paraszimpatikus rendszerektől, mégis ezt a felosztást egészen a nyolcvanas évekig figyelmen kívül hagyták (Langley 1900, Gershon 1998). Azóta viszont széles körben elfogadott a környéki idegrendszer három részre tagolása. Az ENS külön rendszerként való kezelését önálló, saját szabályozása indokolja (Gershon és mtsai. 1994). Az ENS számos funkciót képes koordinálni más szabályozó rendszerektől függetlenül, úgy mint a perisztaltikát, a víz- és ionszekréción (Furness és Costa 1987), a vérellátást (Vanner és Surprenant 1996), a nyálkahártya hámsejtjeinek növekedését (Santos és mtsai. 2000, Holle és mtsai. 2003) és az epehólyag valamint a hasnyálmirigy működését (Kirchgeßner és Gershon 1990). Az ENS funkcionális függetlenségét támasztja alá az a tény is, hogy a nervus vagus preganglionális rostjai csak a duodenum magasságáig futnak (Szentágothai és Réthelyi 1996), tehát az ettől a szakasztól anélkül

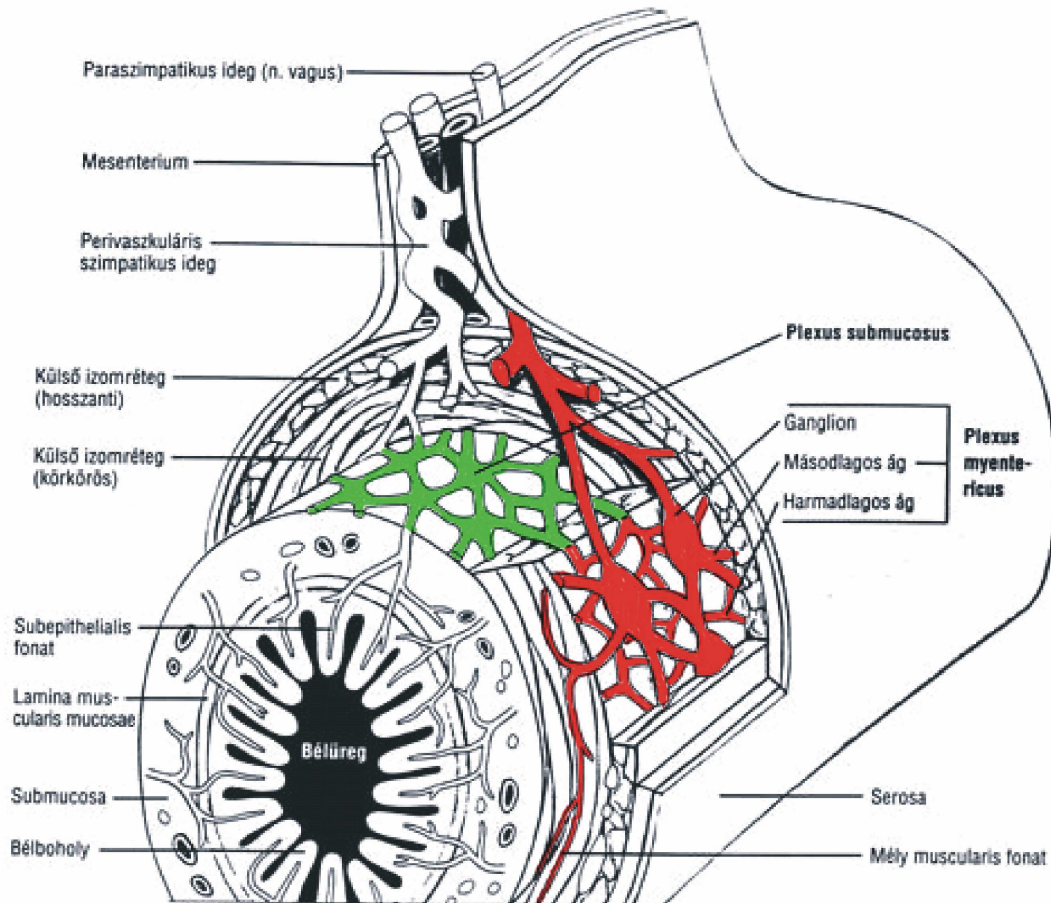
található vékonybelet az ENS-nek kell szabályoznia. Ezt az önálló szabályozást az ENS a saját érző, motoros és interneuronjai közötti, az emésztőcsatorna hosszában ismétlődő lokális reflexívek segítségével valósítja meg (Furness 2000).

Az ENS-t több millió idegsejt alkotja, általában több, mint amennyi az adott állatfaj gerincvelőjében található (Costa és mtsai. 2000). Nemcsak a neuronok nagy száma, de azok neurokémiai komplexitása is jellemzi az ENS-t. Az ENS-ben megtalálható szinte valamennyi ismert neurotranszmitter (Furness és Costa 1987). Nemcsak a klasszikus ingerület-átvivőkre igaz ez, hanem az entericus neuronokban újabban azonosított nitrogén-monoxidra (NO) (Lefebvre 1995) és szén-monoxidra (CO) (Zakhary és mtsai. 1997, Donat és mtsai. 1999) is.

A bélfal minden szöveti rétegében: a nyálkahártyában, a lamina muscularis mucosae-ban, a submucosában, az izomrétegekben és azok között valamint a subserosában is megtalálható az adott réteg saját idegi fonadéka vagy plexusa (Furness és Costa 1987). Magasabbrendű gerincesekben ezek közül kettőben a neuronok ún. internodális ágakkal összekötött ganglionokba tömörülnek. Ez a két ganglionált plexus a plexus submucosus Meissneri (PS) és a plexus myentericus Auerbachii (PM) (Meissner 1857, Auerbach 1864). A PS a bélnyálkahártya alatti kötőszövet és a körkörös simaizomréteg között található (1. ábra), idegelemeit elsősorban érző neuronok és szekretomotoros idegsejtek adják. A PM a körkörös és hosszanti simaizomrétegek között helyezkedik el (1. ábra) és motoneuronokat valamint az epehólyaghoz és a hasnyálmirigyhez (Kirchgessner és Gershon 1990) projektáló idegsejteket tartalmaz. A PM az emésztőcsatorna teljes hosszában megtalálható, a PS azonban hiányzik a nyelőcső és a gyomor falából. A myentericus és submucosus ganglionok mérete erősen faj- és bélszakaszfüggő. Általánosságként azonban elmondható, hogy ugyanazon



bélszakaszban a myentericus ganglionok nagyobbak a submucosus ganglionoknál (Furness és Costa 1987).



**1. ábra** Az emlős bélső keresztmetszeti sematikus képe. Az ENS két ganglionált idegfonadékból épül fel, ezek a plexus submucosus (PS) és a plexus myentericus (PM). A PS a bélfal nyálkahártyája alatti kötőszövetben található. Ez a plexus elsősorban a szekréciót és felszívást szabályozó neuronokat tartalmaz. A PM a hosszanti és körkörös izomréteg között helyezkedik el és főleg motoros idegsejteket tartalmaz. Az erek, a szimpatikus és paraszimpatikus rostok a mesenterium mentén lépnek be a bélfalba (Gershon, 1998 nyomán).

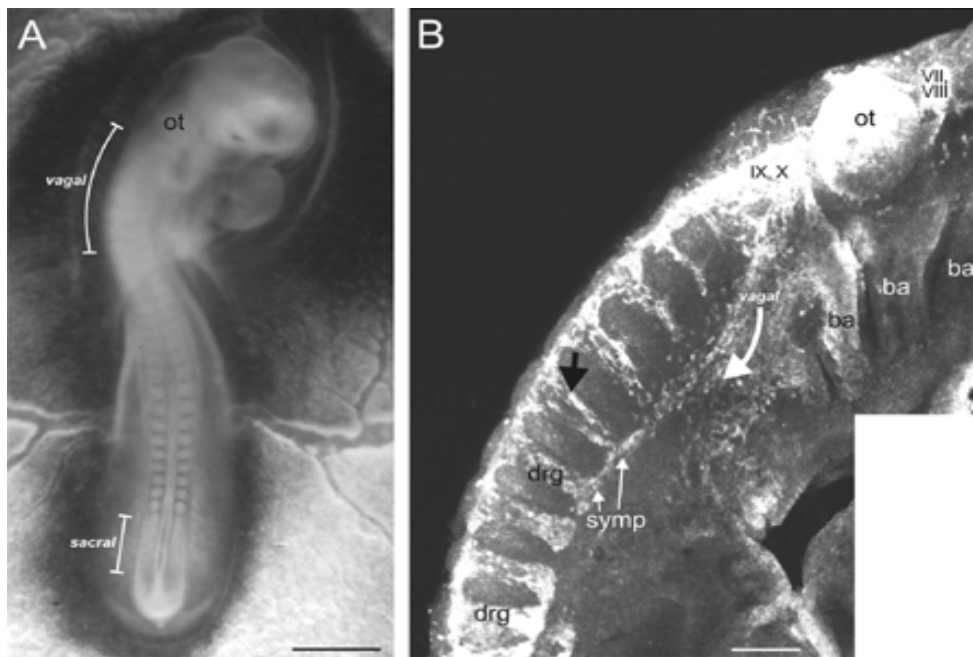
Az entericus neuronokat elsőként az orosz hisztológus, Dogiel osztályozta dendritjeik alakja illetve hossza alapján. Dogiel eredetileg két idegsejt típust különített el (Dogiel 1896). A Dogiel I-es típusú neuronok viszonylag kis méretűek, egy hosszú nyúlvánnyal (uniaxonalis) és sok rövid nyúlvánnyal (multidendriticus) rendelkeznek, ezeket a neuronokat funkciójukat tekintve motoneuronnak tartják. A Dogiel II-es

típusba tartozó idegsejtek nagyobbak, több hosszú nyúlvánnyal rendelkeznek (multiaxonalis) és általában nincsenek rövid nyúlványaik (adendriticus), funkciójukat tekintve valószínűleg szenzoros vagy szekretomotoros idegsejtek. Az ismeretlen funkciójú Dogiel III-as típusú neuronok hasonlítanak a Dogiel I-es típusú neuronokra, de kevesebb dendritjük van és axonjuk az I-es típustól eltérően hosszan követhető. Azóta elektrofiziológiai módszerekkel további sejtípusokat is sikerült azonosítani, ezek a filamentózus, a IV-es típusú, az V-ös típusú, a VI-os típusú és az ún. kis neuronok (Brehmer és mtsai. 1999a). A morfológiához azonban nehéz funkciót rendelni és a különböző típusoknak csak egy kis részéről tudjuk, hogy mi a szerepük. A filamentózus neuronokat leszálló interneuronoknak (Clerc és mtsai. 1998), a IV-es típusú neuronokat szekretomotoros idegsejteknek (Brehmer és mtsai. 1999b), míg a kis neuronokat motoneuronoknak (Clerc és mtsai. 1998) vagy mucosalis efferenseknek (Brehmer és mtsai. 1999b) tekintik.

## **1.2. A bélidegrendszer embrionális fejlődése**

Az ENS, hasonlóan a környéki idegrendszer többi részéhez, a dúclécből fejlődik (Le Douarin 2004). Az entericus neuronok és gliasejtek prekursorai a vagalis és sacralis dúcléc területéről származnak (2. ábra) (Taraviras és Pachnis 1999). A vagalis eredetű dúclécsejtek az előbél magasságában lépnek be a bélcső mesenchimájába, majd anális irányban vándorolva kolonizálják a bélcsatornát annak teljes hosszában (Le Douarin és Teillet 1973). Így a vagalis dúclécsejtek hozzájárulnak a teljes ENS idegi és gliális elemeihez. Ezek a vagalis prekursorok két fejlődési vonalat képeznek. Az egyik fejlődési vonalat az 1-5. őcsigolya magasságából származó prekursorok (az ún. sympathoentericus vonal) reprezentálják, ezek azok a sejtek, amelyek az entericus

ganglionok létrehozásához a bél teljes hosszában hozzájárulnak (Durbec és mtsai. 1996). A másik fejlődési vonalat a 6-7. szomita magasságából eredő dúclécsejtek képviselik (az ún. sympathoadrenalis vonal), ezek leszármazottai alapvetően a nyelőcső és gyomor falát népesítik be (Durbec és mtsai. 1996).



**2. ábra A,** Az ENS neuronális és gliális elemei a dúcléc két területéről, a vagalis (vagal) és sacralis (sacral) dúcléc területéről származnak. **B,** A HNK-1 elleni antitesttel jelölt vagalis dúclécsejtek legproximálisabb csoportjai hozzájárulnak a VII., VIII., IX. és X. agyideg cranialis ganglionjainak létrehozásához és a garatívekbe (ba) is bevándorolnak. A hallóhólyagtól (ot) caudalisan elhelyezkedő dúclécsejtek ventralis és caudalis irányban rajzanak ki (vastag fehér nyíl) a dúcléc területéről. A vagalis régiótól caudalisan elhelyezkedő dúcléc (fekete nyíl) a hátsógyöki ganglionokat (drg) és a szimpatikus dúcláncot (symp) hozza létre. Mindkét ábra korai embrionális stádiumú madár embriót mutat (Newgreen és Young, 2002b nyomán).

Az ENS sejtjeinek másik fő forrása a 28. őscsigolyától caudalisan elhelyezkedő sacralis dúcléc, melynek sejtjei csupán az ún. postumbilicalis bélfalat kolonizálják (Le Douarin és Teillet 1973, Pomeranz és Gershon 1990). A sacralis dúclécsejtek először a bélcső testüreg felé tekintő oldalán feji irányban vándorolnak, és madarakban az ún. Remak-ganglionná, míg emlősökben az ezzel analógnak tekinthető autonóm pelvicus

ganglionná tömörülnek (Kapur 2000). Később ezek a prekursorsejtek a ganglionokat elhagyva belépnek a bélfalba és ott neuro- valamint glioblastokká differenciálódnak (Doyle és mtsai. 2004).

A kizárólagos vagalis és sacralis dúcléci eredet dogmáját látszik megengatni egy közelmúltban megjelent vitatott munka, mely szerint a velőcső ventralis utóagyi részéből is származnak ENS komponensek (Erickson és Weston 1999, Sohal és mtsai. 2002). Ezek a cranialis eredetű prekursorsejtek (ventrally emigrating neural tube cells; VENT sejtek) az agyidegek mentén vándorolnak, jóval azután, hogy a dúclécsejtek már befejezték vándorlásukat, nem expresszálnak dúcléc antigént (HNK-1) és kizárólag az előbelet kolonizálják. Az előbélbe érkezve nemcsak entericus neuronokká és gliasejtekké, hanem Cajal-féle interstitialis sejtekké, sőt még epithelialis sejtekké is differenciálódnak (Sohal és mtsai. 2002). Ezt az új felfedezést azok a korábbi eredmények is megerősítik, melyek szerint a vagalis dúcléc elroncsolása (Epstein és mtsai. 1991) vagy a c-ret gén kiiktatása esetén (Durbec és mtsai. 1996) is kifejlődik az előbéli ENS.

### **1.3. A bélidegrendszer ingerületátvivő anyagai**

Az ENS neurokémiaailag is nagyfokú komplexitást mutat, mivel minden ingerületátvivő anyag, amely jelen van a központi idegrendszerben, megvan az ENS-ben is. Eddig többek között az acetil-kolinról (ACh), a noradrenalinról (NA), a NO-ról (Lefebvre 1995, Mashimo és mtsai. 1996), a VIP-ről (vasoactive intestinal peptide), a szerotoninról (5-HT) és a glutamátról (Kirchgessner 2001) bizonyították, hogy az ENS-ben neurotransmitter funkcióval rendelkezik. Ezek mellett számos más neuromodulátor is jelen van az ENS-ben. Ilyen modulátorok például az ATP, a tachykinin, az enkefalin,

a PACAP (pituitary adenylate activating polypeptide), a neuropeptid Y, a GABA (gamma aminobutyric acid), a szomatosztatin, a kolecisztokinin, a galanin és még számos más vegyület (Furness és Costa 1987, Furness 2000).

### **1.3.1. A nitrerg rendszer**

A bélizomzat motoros szabályozása eltér más izmokétól. A kontrakciót kiváltó serkentő neuronok, hasonlóan más izmokhoz, itt is kolinergek, a gátló neuromuscularis transzmisszió azonban a bélben az ún. nem adrenerg, nem kolinerg (NANC) ingerületátvitellel valósul meg (Bogers és mtsai. 1991, Bredt és Snyder 1994, Mashimo és mtsai. 1996). A NANC transzmissziót folytató gátló motoneuronok elsősorban NO-t és VIP-et, kisebb mértékben ATP-t, CO-t és PACAP-ot szabadítanak fel (Furness 2000). Ezek a gátló neuronok szabályozzák a perisztaltikus reflex leszálló, a simaizmot relaxáló fázisát (Furness 2000). A bél simaizomzatának és bizonyos entericus neuronoknak a nitrerg beidegzése ultrastrukturális (Llewellyn-Smith és mtsai. 1992, Matini és Faussone-Pellegrini 1997) és fénymikroszkópos szinten (Fekete és mtsai. 1999, Salmhofer és mtsai. 2001) is bizonyított.

A motoros szabályozásban szerepet játszó NO-t a neuronális nitrogén-monoxid-szintáz (ncNOS) enzim termeli (Bredt 1995). Az ncNOS pontos szubcelluláris lokalizációja még bizonytalan, annyi viszont bizonyos, hogy nem kötött vezikulákhoz (Van Geldre és mtsai. 2004). A NO alapvetően különbözik más neurotranszmitterektől abban, hogy oldékony, gáz halmazállapotú, nem tárolódik vezikulákban és nincs receptora sem. A célsejtekbe diffúzióval jut be és ott a citoplazmában található guanilát-cikláz enzimet aktiválja. Így a NO hatása a ciklikus guanin-monofoszfát (cGMP) szint megemelése (Bredt és Snyder 1994).

Mivel a nitrerg neuronok funkciójukat tekintve, kevés kivétellel (Li és Furness 2000), motoneuronok, ezért szinte kizárólag Dogiel I-es morfológiát mutatnak (Sayegh és Ritter 2003). A nem motoros funkciójú nitrerg neuronok leszálló interneuronok, ezekben a neuronokban a NO mellett gyakran található ACh és VIP is (Furness 2000, Brehmer és mtsai. 2004).

A nitrerg rendszer fejlődésének vizsgálata során úgy találták, hogy madaraknál a nitrerg sejtek két iniciációs helyen, fűrjben a zúzógyomor és az ileocecalis junktó területén (Boros és mtsai. 1994), csirkében pedig a patkóbél és vastagbél területén (Balaskas és mtsai. 1995a) differenciálódnak elsőként. A nitrerg sejtek az embrionális fejlődés korai szakaszában jelennek meg a bélfalban, 1-2 nappal azután, hogy az első neuronok kimutathatók (Fairman és mtsai. 1995); vagyis csirkében a 4-5. embrionális napon. Emlősökben az elsőként megjelenő neuronok az ún. átmenetileg katekolaminokat termelő idegsejtek (Teitelman és mtsai. 1981). Egerekben és patkányokban ezekből differenciálódnak az első nitrerg neuronok (Newgreen és Young 2002b), madarakban viszont ilyen katekolaminerg neuronok nincsenek. A legelső nitrerg neuronok rövid időn belül axonokat hoznak létre (Young és mtsai. 1999), amelyek anális irányban növekednek. Ez megfelel a kifejlett ENS nitrerg neuronok projekciós irányának (Sang és mtsai. 1997). A transzmitter fenotípus megváltoztatása (katekolaminerg-nitrerg tranzíció) más ENS neuronpopuláció esetében nem ismert. A VIP, mely számos entericus neuronban kolokalizál a NO-val és az utóbbinak kotranszmittere is – hasonlóan a nitrerg neuronokhoz – két, egymástól független helyen kezd kifejeződni a csirkeembrióban (Epstein és Poulsen 1991).

A nitrerg neuronok által termelt NO nemcsak a motoros szabályozásban vesz részt, hanem szerepe lehet az ENS-re jellemző plaszticitás és adaptáció kialakításában (Yunker és Galligan 1994), sőt trophicus hatással lehet a környező sejtekre és

szabályozhatja más neuronok túlélését és differenciálódását is (Ogura és mtsai. 1996, Van Ginneken és mtsai. 1998, Sandgren és mtsai. 2003).

### **1.3.2. A glutamáterg rendszer**

Az utóbbi évek kutatásai arra engednek következtetni, hogy a glutamát nemcsak a központi, de a környéki idegrendszerben, azon belül az ENS-ben is neurotranszmitterként működik (Sinsky és Donnerer 1998, Kirchgessner 2001). Az ingerületátvitelhez szükséges komponensek, úgy mint a glutamátot termelő neuronok (Liu és mtsai. 1997) és a glutamáterg idegvégződéses (Liu és mtsai. 1997, Kirchgessner 2001), a különböző glutamát receptor mRNS-ek (Broussard és mtsai. 1994, Burns és mtsai. 1994, Burns és Stephens 1995, Tong és Kirchgessner 2003) és receptor fehérjék (Galligan 2002) valamint a transzporterek (Liu és mtsai. 1997, Tong és mtsai. 2001) megtalálhatók a bélben. A glutamáterg neurotranszmisszióhoz szükséges komponensek mellett azonosították a glutamát által közvetített fiziológiai folyamatokat is. A glutamát szerepet játszik a lokális reflexek irányításában (Kirchgessner 2001), más entericus neuronok működésének módosításában (Cosentino és mtsai. 1995, Giaroni és mtsai. 2003) és a vago-vagalis reflexek közvetítésében is (Hornby 2001, Zhang és Fogel 2003).

A viszonylag kis számú idegsejtből álló glutamáterg neuronpopuláció mind a PS-ben, mind a PM-ben megtalálható (Liu és mtsai. 1997). Tengerimalacban a glutamáterg neuronokban gyakran van kolin-acetiltranszferáz és P-anyag (Liu és mtsai. 1997). Ebből úgy tűnik, hogy a glutamát és az ACh serkentő kotranszmitterek (Kirchgessner 2001). A glutamáterg neuronok nagy részét ún. helyi elsődleges érző neuronnak gondolják (intrinsic primary afferent neuron, IPAN).

Az IPAN-ok kollaterálisokkal projektálnak a nyálkahártyához. Ezekkel a nyúlványokkal az ún. enterochromaffin sejtek által közvetített információkat fogják fel (Kirchgeßner 2001, Furness és mtsai. 2004). Az enterochromaffin sejtpopuláció a nyálkahártyában található, ezek a sejtek a béltartalom összetételének (pH, glükóz, rövid láncú zsírsavak) vagy az abban uralkodó nyomásnak megfelelően 5-HT-t vagy más hormonokat szabadítanak fel (Kirkup és mtsai. 2001, Gershon 2003). Az általuk felszabadított molekulákat (például 5-HT-t) a nyálkahártya alatti IPAN kollaterálisok receptoraikkal érzékelik. Az IPAN-ok vagy a nyálkahártyához bocsájtott nyúlványaikon keresztül (Liu és mtsai. 1997) vagy szekretomotoros neuronokkal szinaptizálva váltanak ki víz- és ionszekréción reflexet (Furness 2000, Kirchgeßner 2001), illetve motoneuronokra hatva perisztaltikus reflexet (Grider és mtsai. 1996). A bélnyálkahártya víz- és ionszekréciónját a szekretomotoros neuronok által felszabadított ACh és VIP válthatja ki (Furness 2000). E funkciókkal összhangban, szinte minden glutamáterg neuron a szekretomotoros vagy szenzoros neuronokra jellemző Dogiel II-es morfológiát mutat (Liu és mtsai. 1997).

A szekréción közvetlen szabályozása mellett a glutamát más, nem szekretoros ACh és VIP tartalmú entericus neuronok működését is szabályozza (Burns és Stephens 1995, Cosentino és mtsai. 1995, Giaroni és mtsai. 2003). Mivel mindkét neurotranszmitter megtalálható motoneuronok különböző csoportjaiban (Furness 2000), valószínű, hogy a glutamát a szekréción kívül a perisztaltikát is képes szabályozni (Cosentino és mtsai. 1995, Sinsky és Donnerer 1998). Ezt erősíti az a megfigyelés is, hogy az enterochromaffin sejtekből kiinduló jel az IPAN-okon keresztül perisztaltikus reflex kiváltásához vezet úgy, hogy serkenti a kolinerg motoneuronokból az ACh felszabadítást, ami simaizom kontrakciónhoz vezet (Gershon 2003). A glutamát a bélből



készített szervpreparátumokon is simaizomkontrakciót vált ki (Jankovic és mtsai. 1999, Milovanovic és Jankovic 2002).

Az ENS-ben kimutatták mind az ionotróp, mind a metabotróp glutamát receptorok jelenlétét (Liu és mtsai. 1997, Kirchgessner 2001). Ezek közül az N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptor fordul elő legnagyobb gyakorisággal (Kirchgessner 2001). Az NMDA receptorok megtalálhatók az entericus idegsejtek mellett a vagalis és spinalis afferens nyúlványok perifériás végződésein is (Kirchgessner 2001), az utóbbi nyúlványokhoz tartozó sejtek a hátsógyöki ganglionokban és a ganglion nodosumban helyezkednek el. Az NMDA receptorokat öt alegység építi fel, ezek az alegységek az NR1 és NR2 gének (NR2A-D) termékei. Az NR1 alegység maga is képes funkcionális receptor létrehozására, de az NR2-es alegységek hatékonyabbá teszik a receptort (Aicher és mtsai. 2000). Az NR1 alegység önállóságát az is mutatja, hogy míg az NR1 alegységet patkányban szinte valamennyi entericus neuron expresszálja, addig az NR2-es alegységek eloszlása sokkal korlátozottabb (Liu és mtsai. 1997).

#### **1.4. A bélidegrendszeren végzett kvantitatív vizsgálatok rövid áttekintése**

A BI-en végzett kvantitatív vizsgálatok három fő területre terjedtek ki; (1) összneuronszám vizsgálata, (2) a különböző neurokémiai sajátosságokkal rendelkező enteralis neuronok kvantitatív sajátosságainak vizsgálata és (3) az enteralis neuronok térbeli mintázatának, illetve a mintázat régióspecifikus különbségeinek vizsgálata

Az összneuronszám meghatározására a NADH-d festést (Gabella 1987, Young és mtsai. 1993, Braganca de Vasconcellos Fontes és mtsai. 2004), a konstitutív nukleáris onkoproteinek (Parr és Sharkey 1994, Karaosmanoglu és mtsai. 1996), a PGP 9.5 (protein gene product 9.5) neuronális ubiquitin (Timmermans és mtsai. 1999) és a

HuC/D (Phillips és mtsai. 2004) elleni immuncitokémiai festéseket, az ezüstimpregnációt (Brehmer és Stach 1998) és a kuprolin kék hisztokémiai festést (Karaosmanoglu és mtsai. 1996, Schäfer és mtsai. 1999, Román és mtsai. 2001, Phillips és mtsai. 2004) alkalmazták. A legtöbb kvantitatív eredmény a tengerimalac bélidegrendszeréből ismert, mivel itt a nagy entericus ganglionokban az egyes neuronok akár szabad szemmel is jól láthatók és számolhatók. A tengerimalac egy ganglionra eső NADH-d-pozitív neuronjainak száma 105 (Young és mtsai. 1993), míg az összneuronszám 3 millió körül volt (Gabella 1987). Egy onkoprotein immuncitokémiai vizsgálatban szintén tengerimalacban az egy myentericus ganglionra eső neuronszám 50 körül volt (Parr és Sharkey 1994). Egy kuprolin késsel végzett munkában a tengerimalac vékonybelében az összneuronszámot több mint 6 millióra becsülték (Karaosmanoglu és mtsai. 1996). A bemutatott irodalmi adatok alapján a különböző festési módszerekkel kapott kvantitatív eredmények nehezen vethetők össze. Az összneuronszám meghatározására jelenleg a két legelfogadottabb módszer a kuprolin kék hisztokémiai festés és a Hu immuncitokémiai festés (Phillips és mtsai. 2004). Laboratóriumunkban az összneuronszám meghatározásához a kuprolin kék festést alkalmaztuk. A festési eljárás azon alapszik, hogy a kuprolin kék magnézium ionok jelenlétében hozzákapcsolódik az egyesszálú RNS-ekhez (Mendelson és mtsai. 1983, Holst és Powley 1995). Mivel az idegsejtek szintetikusán sokkal aktívabbak, mint a környező sejtek, sokkal több egyesszálú RNS-t is tartalmaznak, ezért kitüntetten festődnek kuprolin késsel.

A különböző neurokémiai sajátosságú entericus neuronok közül a nitrerg neuronok kvantitatív jellemzőit vizsgálták legtöbben. A nitrerg neuronokra jellemző ncNOS-immunreaktivitás és a NADPH-d enzimaktivitás számos fajban teljes kolokalizációt mutat (Belai és mtsai. 1992, Ward és mtsai. 1992, Timmermans és mtsai. 1994,

Balaskas és mtsai. 1995a, Brandt és mtsai. 1996, Mirabella és mtsai. 2000). Ezért mind az ncNOS immunhisztokémia, mind a NADPH-d hisztokémia alkalmas a nitrerg neuronpopuláció azonosítására. A nitrerg neuronok bélszakasztól és fajtól függően körülbelül 20-38%-át adják az ENS teljes neuron populációjának (Cracco és Filogamo 1994, Jarvinen és mtsai. 1999, Timmermans és mtsai. 1999). Sajátos módon a nyelőcsőben a nitrerg neuronok aránya rendkívül magas, meghaladhatja a 65%-ot is (Wu és mtsai. 2003).

Az entericus neuronok térbeli eloszlását kevesen vizsgálták. Kvantitatív regionális különbségeket, mint teljes neuronszám, idegsejtípusok gangliononkénti megoszlása, térbeli mintázatok analízise, vizsgáltak tengerimalacban (Karaosmanoglu és mtsai. 1996), patkányban (Cracco és Filogamo 1994, Jarvinen és mtsai. 1999, Schäfer és mtsai. 1999, Timmermans és mtsai. 1999, Sayegh és Ritter 2003, Wu és mtsai. 2003), sertésben (Brehmer és Stach 1998, Van Ginneken és mtsai. 1998), csirkében (Bagyánszki és mtsai. 2000, Román és mtsai. 2001) és humán mintákban (Wester és mtsai. 1998, Román és mtsai. 2004).

## **2. Célkitűzések**

Az elmúlt évtizedekben sok adat gyűlt össze a bélidegrendszer felépítéséről, fejlődéséről és működéséről (Gershon 1998, Taraviras és Pachnis 1999, Furness 2000), de számos kérdés még nyitott maradt. Különösen igaz ez az ENS különböző neuronpopulációinak embrionális fejlődésére illetve a végső neuronális fenotípus elnyerésére. Mivel az ENS felépítésében alapvető faji különbségek vannak, fontos, hogy a vizsgálatok több fajra terjedjenek ki, hiszen így kaphatunk választ arra, hogy milyen mértékben általánosíthatók a kísérletes eredmények az egyes állatcsoportok között. Vizsgálatainkat fejlődő csirke és humán magzati ENS-en végeztük és három fő területre koncentráltuk.

### ***I. A bélidegrendszer nitrerg neuronjainai vizsgálata fejlődő csirkeembrióban***

Ezen vizsgálatok során a következő kérdésekre kerestük a választ:

I.1. A csirke ENS nitrerg neuronjai mutatnak-e bélszakaszspecifikus változásokat a 12., 13., 14. és 19. embrionális napokon?

I.2. Milyen kvantitatív változások következnek be a csirke ENS nitrerg neuronális populációjában a bélcsatorna teljes hosszában a 13. és 19. embrionális napokon?

### ***II. A teljes neuronszám változásai a kikelés előtti csirkeembrióban és frissen kikelt csirkében***

Ezen vizsgálatok során a következő kérdésekre kerestük a választ:

II.1. Van-e megbízható festési eljárás a teljes neuronszám meghatározására fejlődő csirke ENS-ben?

II.2. Ha van ilyen módszer, az milyen hatékonysággal jelöli a neuronokat összevetve más, a teljes neuronszám meghatározására használt hisztokémiai, vagy immuncitokémiai technikával.

II.3. Az ENS összneuronszámában van-e bélszakaszspecifikus kvantitatív különbség a kikelés előtti csirkeembrió és a frissen kikelt csirke belében?

### ***III. A fejlődő humán bélidegrendszer glutamáterg rendszerének vizsgálata***

Ezen vizsgálatok során a következő kérdésekre kerestük a választ:

III.1. Vannak-e glutamát immunpozitív neuronok a 18 hetes humán magzati ENS-ben?

III.2. Vannak-e glutamát-receptív, NMDA receptorokat expresszáló neuronok a 18 hetes humán magzati ENS-ben?

III.3. Milyen a funkcionális NMDA receptorokat tartalmazó neuronok kémiai kódja?

### 3. Anyagok és vizsgálati módszerek

#### 3.1. Csirke vizsgálati anyag előkészítése

A csirkén (*Gallus domesticus L., Leghorn*) végzett kísérletekhez 38°C-on inkubált csirke embriókat és frissen kikelt csirkéket használtunk. Vegyszereink, ha másként nem jelöltük, a Sigma cégtől származtak. Munkánk során szigorúan ragaszkodtunk a kísérleti állatok kezelésével kapcsolatos Európai Unió etikai előírásokhoz (86/609/EEC). A nitrerg rendszeren végzett kísérletek esetében az embriókból a 12., 13., 14. és 19. inkubációs napon kiboncoltuk a teljes bélcsatornát (n=5). Az összneuronszám meghatározására irányuló kísérletben az embriókból a 19. inkubációs napon, a kikelt csirkékből pedig az 1., 2., 4. és 7. kikelést követő napon távolítottuk el a bélcsatornát (n=5), az állatokat dekapitáltuk. A bélcsatornát foszfát pufferrel (PB; 0,1 M) átmostuk, feltöltöttük 4%-os paraformaldehid-oldattal (0,1 M PB-ben készítve), majd a feltöltött beleket belemerítve, ugyanebben az oldatban fixáltuk 4 órán át szobahőmérsékleten. A fixálást követően a mintákat PBS-ben (0,05 M) mostuk. Miután embrionális korban az egyes bélszakaszok nem különíthetők el egyértelműen, ezért a pylorus záróizmot és az ileocecalis junkciót jelöltük ki, mint anatómiai tájékozási pontokat, s minden vizsgált életkorban ezekhez a tájékozási pontokhoz viszonyítva vágtuk ki a megfelelő darabokat a bélből. A nitrerg rendszeren végzett vizsgálat során a vékonybél területéről egy proximális és egy disztális szegmentet, a vastagbél területéről pedig egy szegmentet különítettünk el (a 12-14 napos belek esetében 2,5 cm, a 19 napos minták esetében 3,5 cm volt a kiválasztott szakaszok hossza). A proximális vékonybél minták a duodenum pylorustól számított 2,5-3,5 cm-ét tartalmazták, a disztális vékonybél mintákat az ileumnak az ileocecalis junkciótól számított 2,5-3,5 cm-e képezte, a vastagbélből vett

minta az ileocecalis junkciótól disztálisan elhelyezkedő 2,5-3,5 cm-es darabból állt. Az összneuronszám meghatározására végzett vizsgálatunkban minden minta hossza 2-3 cm volt. A mintákat az előzőekben leírtak szerint izoláltuk, azonban az összneuronszám meghatározásához egy a vékonybél közepéről (a pylorus és az ileocecalis junkció között) kivágott negyedik bélszakaszt is megvizsgáltunk.

A kivágott bélszakaszokból bélnyúzat (wholmount) preparátumokat készítettünk. Ehhez a bélszegmenteket sztereomikroszkóp alatt a mesenteralis határon felvágtuk, majd a nyálkahártyát és az alatta lévő kötőszövetet mikroszikkével eltávolítottuk. Ezután csipesszel lehúztuk a körkörös simaizomzat rostjait, így a hosszanti izomréteg és a felszínén lévő PM szabaddá vált.

### **3.2. Humán vizsgálati anyag előkészítése**

A kísérletekben használt humán mintákat a Szegedi Tudományegyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikával kialakított kooperációban a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Etikai Bizottságának engedélyével kaptuk. Az Etikai Bizottság a szabályok meghozatalánál a Helsinkai Deklarációban rögzítetteket vette alapul (Medical World Federation, 1964).

A humán vizsgálati anyag legális művi vagy spontán abortuszokból származott. A gesztációs kor meghatározására a fejtető-sarok távolságot (Moore 1989), illetve az utolsó menstruáció időpontját használtuk. Kísérleteink során 18 hetes gesztációs korú magzatokból származó vékonybeleket fixáltunk, majd a 3.1. pontban leírtaknak megfelelően bélnyúzat preparátumokat készítettünk belőlük.

### **3.3. Paraffinmetszetek készítése**

A 18 hetes humán magzatokból származó mintákat emelkedő koncentrációjú alkoholsorozatban és xilolban víztelenítettük, majd alacsony olvadáspontú (54°C) paraffinban (Paraplast) inkubáltuk egy éjszakán át. Az infiltrálódott mintákat paraffinba ágyasztuk és a paraffin megszilárdulása után Reichert szánkamikrotómmal 8 µm vastagságú metszeteket készítettünk. A deparaffináláshoz xilolt és csökkenő ethanolkoncentrációjú oldatokat használtunk.

### **3.4. NADPH-diaforáz hisztokémiai festés**

A NADPH-d festést Scherer-Singer és mtsai. (1983) módszere alapján végeztük. A bélnyúzat preparátumokat nitroblue tetrazolium (NBT) (0,25 mg/ml), β-NADPH (1 mg/ml) és Triton X-100 (0,5%) PBS-ben (0,05 M, pH 7,4) készített oldatában inkubáltuk 1 órán át 37°C-on. A festést követően a mintákat PBS-ben mostuk.

### **3.5. Kuprolin kék hisztokémiai festés**

A festést a bélnyúzat preparátumokon Holst és Powley módszere (1995) alapján, kisebb módosításokkal végeztük. A mintákat Triton X-100 0,1%-os PB-ben készített oldatában 90 percig inkubáltuk, majd PB-ben és desztillált vízben mostuk. A kuprolin kéket (0,5% w/v) 0,05 M-os nátrium-acetát pufferben oldottuk fel (pH 5,6), és az oldathoz 1,0 M magnézium-kloridot adtunk. A kuprolin kék oldatot 0,22 µm-es Millipore filteren átszűrtük és egy fecskendő segítségével az oldatot kimélyített tárgylemezre juttattuk. A mosott preparátumokat a kuprolin kék oldatcseppekbe



helyeztük. A mintákat 2 órán át nedves kamrában 37°C-on inkubáltuk. Az inkubáció után a mintákat desztillált vízben mostuk majd 0,05 M-os nátrium-acetát pufferben (pH 5,6) 20 percig differenciáltuk. A neurofilament és kuprolin kék kettősfestések esetében mindig a kuprolin kék festést végeztük el először.

### **3.6. Immuncitokémiai festések**

A 200 kDa-os neurofilament (NF), NMDA-receptor alegységek, glutamát, NOS és VIP ellen készített ellenanyagok felhasználásával egyszeres és többszörös immunjelöléseket alkalmaztunk paraffinmetszeteken és bélnyúzat preparátumokon. Normál szérumként minden ellenanyagoldat készítésénél normál kecske vagy szamár szérumot használtunk (10%-os PBS-ben készített oldat). Előinkubációhoz ugyancsak normál kecske vagy szamár szérum 10%-os oldatát használtuk 1 órán át. A későbbiekben Cy3-, AMCA-, FITC-konjugált és biotinilált fajspecifikus másodlagos antitesteket használtunk (1-2. táblázat). Minden inkubációs lépés szobahőmérsékleten történt. Az immunfestés során az elsődleges, másodlagos és harmadlagos szérumot PB-ben (0,05 M pH 7,6) mosva távolítottuk el. Harmadlagos szérumként biotinilált sztreptavidin tormagyökér peroxidázt használtunk (Amersham, 1:100, éjszakán át tartó inkubáció). Biotinilált sztreptavidin tormagyökér peroxidáz alkalmazása esetén az immunreakciót diaminobenzidin (DAB) kromogén (0,1 %, 20 perc) és hidrogén-peroxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) szubsztrát (0,033 %, 10 perc) alkalmazásával tettük láthatóvá.

A szérum neve	Gazda	Inkubációs idő	Hígítás	Gyártó
anti-NF	egér	éjszakán át	1:100	Sigma
anti-VIP	nyúl	éjszakán át	1:200	Sigma
anti-glutamát	nyúl	éjszakán át	1:200	Sigma
anti-NR1	nyúl	éjszakán át	1:200	Santa Cruz Biotechnology
anti-NR1/NR2A-2D	kecske	éjszakán át	1:200	Sigma

**1. táblázat.** Az immunhisztokémiai festésekhez használt elsődleges szérumok

A szérum neve	Gazda	Inkubációs idő	Hígítás	Gyártó
Anti-egér biotilált IgG	birka	6 óra	1:100	Amersham
Anti-nyúl Cy3-konjugált IgG	birka	4 óra	1:100	Sigma
Anti-nyúl biotilált IgG	kecske	6 óra	1:100	Amersham
Anti-kecske FITC-konjugált IgG	nyúl	4 óra	1:100	Jackson

**2. táblázat.** Az immunhisztokémiai festésekhez használt másodlagos szérumok

### 3.7. Mikroszkópos módszerek

A festett wholemount preparátumokat glicerín-PBS 3:1 arányú keverékében fedtük le. Ezt követően a fénymikroszkópos vizsgálatok esetében a számolást és fényképezést egy Zeiss AxioCam digitális kamerával felszerelt Zeiss fénymikroszkóp segítségével végeztük. A nitrerg neuronok vizsgálatánál a ganglionokat és a NADPH-d pozitív sejteket 100-szoros nagyításon számoltuk meg 10-10 véletlenszerűen kiválasztott látótérben (1 látótér területe 100-szoros nagyításon  $1,1475 \text{ mm}^2$ ). Az összneuronszám meghatározásakor a ganglionokat és neuronokat 160-szoros nagyításon számoltuk szintén 10-10 véletlenszerűen kiválasztott látótérben (1 látótér területe 160-szoros nagyításon  $0,44 \text{ mm}^2$ ). A glutamáterg rendszeren végzett

vizsgálatok során a neuronokat 400-szoros nagyításnál számoltuk (1 látótér területe 400-szoros nagyításnál  $0,041 \text{ mm}^2$ ) 10-10 véletlenszerűen kiválasztott látótérben. Nagy hangsúlyt fektettünk arra, hogy a ganglionok teljes mélységében megszámláljuk a sejteket. A fluoreszcensen jelölt minták esetében a megfelelő szűrők és egy HBO 100 W higanygőzlámpa alkalmazásával, egy Zeiss AxioCam digitális kamerával felszerelt Zeiss fluoreszcens mikroszkópot használtunk. A perikarion terület mérésekhez AnalySIS Pro szoftvert alkalmaztunk.

### **3.8. Statisztikai módszerek**

A fejlődési állapot (kor) és a nitrerg neuronok vagy az összes neuron számbeli eloszlásának összefüggését kétfaktoros varianciaanalízissel (ANOVA) vizsgáltuk. A varianciaanalízis feltételei; a random mintavétel, a függetlenség és a varianciák homogenitása, teljesültek. A random mintavétel kielégítésére egy-egy preparátumon belül 10 véletlenszerűen kiválasztott látótérben számoltuk a ganglionokat illetve a neuronokat. A különböző korcsoportokból származó minták függetlenek voltak. Mivel a csoportok elemszáma megegyezett, ezért a normalitási feltételt nem kellett megvizsgálnunk. Az adatok homogenitása négyzetgyök transzformáció után teljesült. A homogenitás teljesülését  $F_{\max}$ -próbával ellenőriztük. A varianciaanalízis elvégzését követően a csoportokat összehasonlítottuk a Student-Newman-Keuls-teszt illetve a Tukey-próba segítségével (Zar 1984). Minden statisztikai analízisben a  $P < 0,05$  értéket rögzítettük, mint szignifikancia szintet. A ganglionális és nitrerg vagy teljes neuronális denzitás értékeket a wholemount preparátumok területének  $1 \text{ mm}^2$ -ére számítottuk ki. Az adatokat mint átlag  $\pm$  standard deviáció (SD) vagy standard hiba (SE) ábrázoltuk.

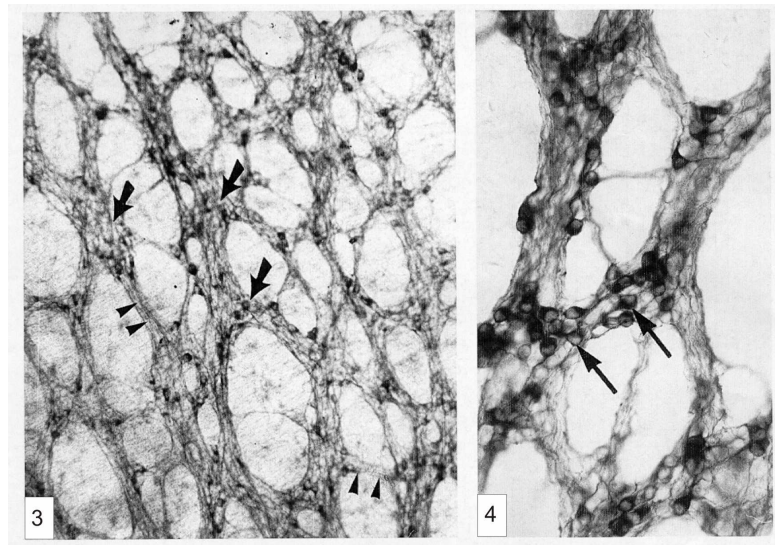
## 4. Eredmények

### 4.1. A bélidegrendszer nitreg neuronjainak vizsgálata fejlődő csirkeembrióban

Kvalitatív vizsgálataink azt mutatták, hogy a PM-ben a ganglionok és internodális ágak a 12. embrionális napon a kifejlett állathoz hasonlóak (3. ábra). A NADPH-d pozitív sejtek perikarionja sötét volt, a sejtmag nem festődött (4. ábra). A dendritek szintén megfestődtek, de a nyúlványok finom elágazódásai már nem látszottak. A nitreg sejtek többsége a ganglionokban volt, csak néhány neuron helyezkedett el az internodális szegmensekben. A 12. és 19. embrionális nap között a PM jól látható morfológiai változáson ment keresztül. A 12. napon a ganglionok közel helyezkedtek el egymáshoz és rövid internodális szegmensekkel összekötve sűrű szövédéket alkottak. A 19 napos embriókban a PM-ben a ganglionok eltávolodtak egymástól, az összekötő szálak megnyúltak és a fonadék fellazult (5. ábra). A vékonybél proximalis szakaszán és a vastagbélben ezek a változások a 13. embrionális napon már jól látszottak, míg a vékonybél distalis részén csak a 14. embrionális napon észleltük az említett morfológiai változásokat. Nemcsak a PM morfológiája változott meg a vizsgált időszak alatt, de az egyes nitreg neuronok alakja, festődési intenzitása és mérete is (6. ábra).

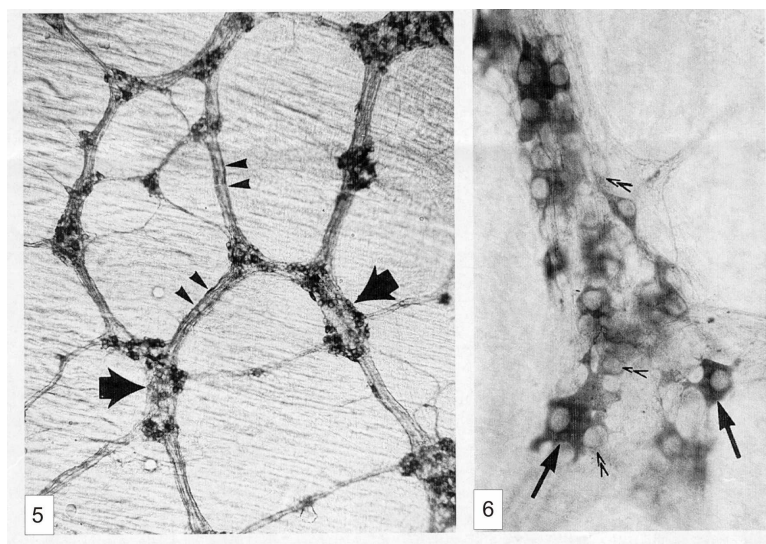
Kvantitatív vizsgálatainkban a ganglionok és nitreg neuronok denzitását, valamint az egy ganglionra eső nitreg neuronok számát tanulmányoztuk (3. táblázat, 7. ábra). Ennek során azt találtuk, hogy a ganglionok területegységre ( $1 \text{ mm}^2$ ) vonatkozó száma (denzitása) különböző mértékben csökkent a három vizsgált bélszakaszban (3. táblázat, 7.A ábra). A vastagbél területén a ganglionok denzitása a 12-13. napok között csökkent szignifikánsan, míg a proximalis és distalis vékonybélben a 13-14. napok közt történt szignifikáns csökkenés. A ganglionok denzitása nemcsak az egyes életkorokban

mutatott regionális különbségeket, hanem egy adott életkorban is voltak különbségek a bélszakaszok között. A 19. embrionális napra a ganglionok denzitása a 12. napon számolt értéknek egyötöde volt. A 19. napon a ganglionok denzitása szignifikánsan különbözött a három vizsgált bélszakaszon. A NADPH-d-pozitív sejtek denzitása az embrionális kor előrehaladtával szignifikánsan ( $p < 0,001$ ) csökkent, de ennek a számbeli csökkenésnek a dinamizmusa az egyes bélszakaszokban eltérő volt (3. táblázat, 7.B ábra). A vékonybél proximalis szakaszában a nitreng sejtek denzitása szignifikáns csökkenést mutatott a vizsgált időszakban. A distalis vékonybélben és a vastagbélben a nitreng sejtek denzitása először a 13-14. embrionális nap között mutatott szignifikáns csökkenést. A 14. napig a három bélszakaszt összehasonlítva, a NADPH-d-pozitív sejtek denzitása között szignifikáns különbség nem volt.



**3. ábra** A 12 napos csirkeembrió beléből készített wholemount preparátum NADPH-d festés után. A különböző méretű ganglionokat (nyíl) rövid internodális szegmentumok (nyílhegy) kötik össze. A PM a hosszanti izomzat felszínén sűrű hálózatot alkot (x240).

**4. ábra** A 3. ábrán látható PM részlete. A közel azonos méretű neuronok (nyíl) főleg a ganglionokban találhatóak, de előfordulnak az internodális szegmensekben is. A sejtek citoplazmája sötétre festődött, a sejtmagok nem festődtek (x670).



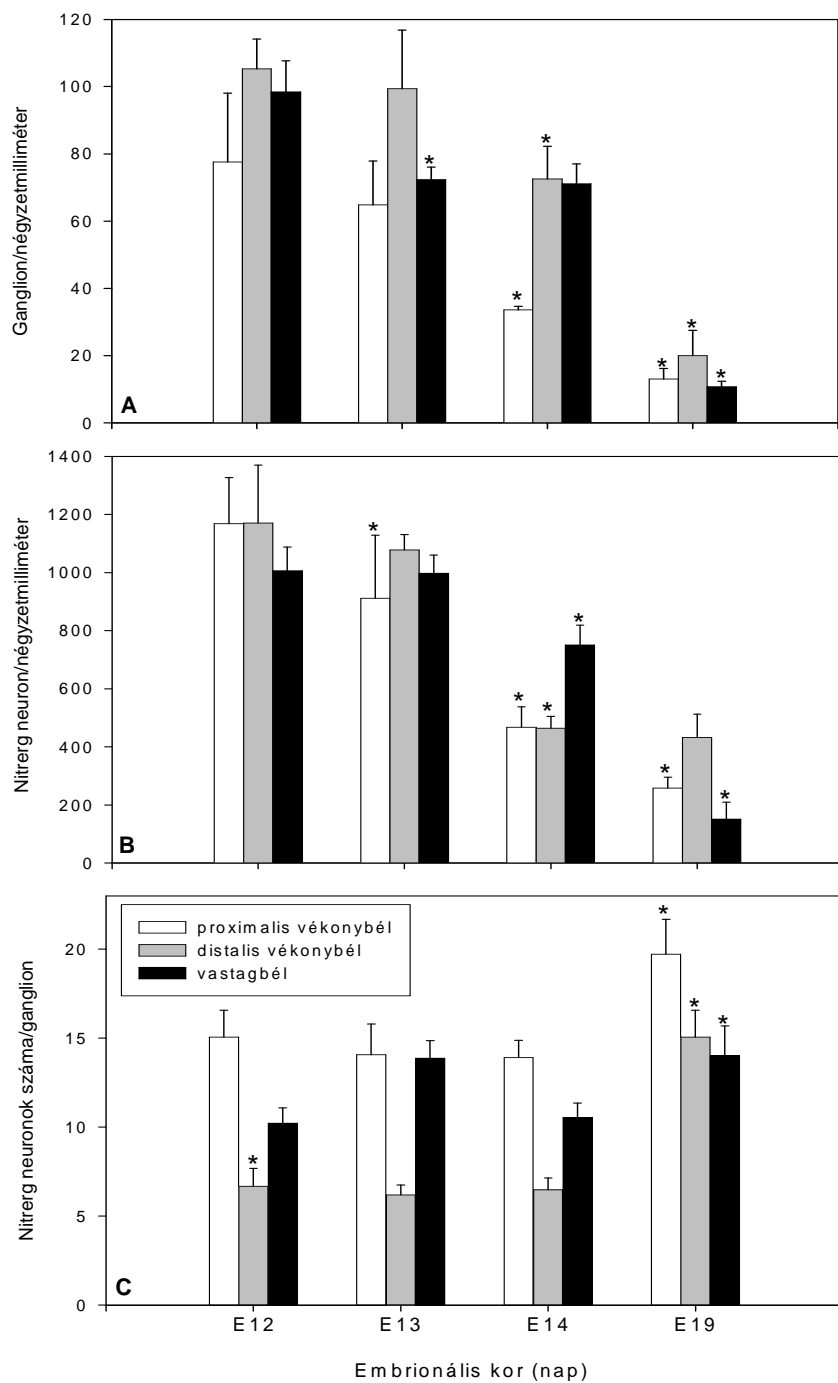
**5. ábra** A 19 napos csirkeembrió beléből készített wholemout preparátum NADPH-d festés után. A ganglionok (nyíl) jól elhatárolódtak egymástól, az internodális szegmentumok (nyílhegy) hosszúak. A hosszanti izomzat felszínén a PM laza hálózatot képez (x240).

**6. ábra** Az 5. ábrán látható PM részlete. A NADPH-d-pozitív sejtek (nyíl) alakja, mérete és festődési intenzitása változatos. Néhány sejten a dendritek (kettős nyílhegy) is megfigyelhetők (x670).

Inkubációs napok	Proximalis vékonybél			Distalis vékonybél			Vastagbél		
	Ggl./mm <sup>2</sup> ±SD	Nitrerg neuron/mm <sup>2</sup> ±SD	Nitrerg neuron/ggl. ±SD	Ggl./mm <sup>2</sup> ±SD	Nitrerg neuron/mm <sup>2</sup> ±SD	Nitrerg neuron/ggl. ±SD	Ggl./mm <sup>2</sup> ±SD	Nitrerg neuron/mm <sup>2</sup> ±SD	Nitrerg neuron/ggl. ±SD
<b>E12</b>	77,56±20,5	1168,45±159,12	15,065±1,5	105,27±8,87	1170,2±199,57	6,667±1,01	98,47±9,18	1006±82,42	10,218±0,87
<b>E13</b>	64,84±12,99	912,07±217,04	14,067±1,72	99,35±17,46	1078,69±53,11	6,198±0,56	72,33±3,7	998,3±62,79	13,869±0,99
<b>E14</b>	33,64±0,99	467,28±70,87	13,898±0,99	72,51±9,73	463,62±40,77	6,48±0,67	71,1±5,93	750,3±68,77	10,55±0,8
<b>E19</b>	13,07±3,08	257,6±38,22	19,707±1,98	20,02±7,48	432,24±80,85	15,067±1,5	10,8±1,58	151,2±57,83	14±1,67

**3. táblázat** A ganglionok denzitása (ganglion/mm<sup>2</sup>), a NADPH-d-pozitív neuronok denzitása (nitrerg neuron/mm<sup>2</sup>) és a nitrerg neuron/ganglion arány a 12., 13., 14. és 19. embrionális napon csirke PM-ben. Az adatok mint átlag±SD szerepelnek a táblázatban.

A 14. napon a vastagbélben több nitrerg neuront találtunk, mint a másik két szegmensben. A 19. inkubációs napon a három vizsgált bélszakaszban a nitrerg neuronok denzitása szignifikánsan különbözött egymástól.



**7. ábra** A ganglionszám (A), a NADPH-d-pozitív sejtszám (B) és a nitroerg neuron/ganglion arány (C) változásait bemutató oszlopdigramok 12, 13, 14 és 19 napos csirkeembrióban. Az adatok mint átlag±SD szerepelnek az ábrán. A 14. naptól a ganglionszámban és a nitroerg sejtszámban szignifikáns ( $p < 0,001$ ) különbség mutatkozott a vizsgált bélszakaszok között. A nitroerg neuron/ganglion arány a 19. inkubációs napra szignifikánsan ( $p < 0,001$ ) megnőtt mindhárom vizsgált bélszakaszban, a distalis vékonybél szakaszban megkétszereződött.

A 12-14. inkubációs napok során a nitrerg sejt/ganglion arány, vagyis az egy ganglionra eső nitrerg neuronok száma, hullámformájú mintázatot mutatott a bélcső hossz tengelye mentén (3. táblázat, 7.C ábra). Ebben az időszakban a NADPH-d-pozitív sejtek száma a proximális vékonybélben és a vastagbélben ganglionként 10-14, míg a distalis vékonybélben csupán 6-7 volt. A 19. embrionális napra ez a mintázat megváltozott, a proximális szakaszon 20 nitrerg neuron volt egy-egy ganglionban, ezzel szemben a distalis vékonybélben és a vastagbélben átlagosan 14-15.

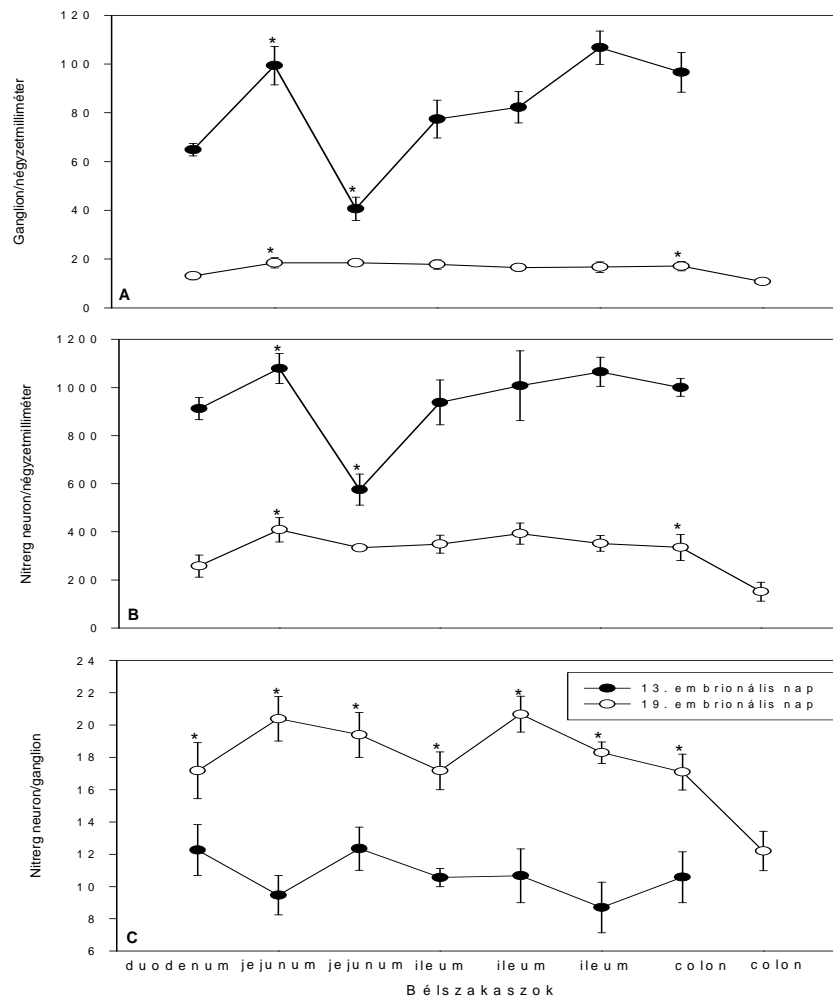
Bélszakaszok	13. embrionális nap			19. embrionális nap		
	Ganglion/ mm <sup>2</sup> ±SD	Nitrerg neuron/ mm <sup>2</sup> ±SD	Nitrerg neuron/ganglion ±SD	Ganglion/ mm <sup>2</sup> ±SD	Nitrerg neuron/ mm <sup>2</sup> ±SD	Nitrerg neuron/ganglion ±SD
Duodenum	64,84 ±2,59	912,07 ±45,72	12,26 ±1,58	13,07 ±1,58	257,6 ±45,97	17,17 ±1,73
Jejunum	99,35 ±7,85	1078,69 ±62,48	9,46 ±1,22	18,47 ±2,12	408,71 ±50,78	20,39 ±1,38
Jejunum	40,61 ±4,77	575,34 ±64,7	12,35 ±1,34	18,47 ±1,48	333,59 ±10,6	19,4 ±1,39
Ileum	77,39 ±7,76	937,52 ±93,15	10,56 ±0,57	17,78 ±1,92	349,11 ±37,25	17,17 ±1,18
Ileum	82,27 ±6,43	1006,89 ±144,82	10,67 ±1,66	16,56 ±1,52	392,68 ±43,66	20,67 ±1,11
Ileum	106,67 ±6,80	1065,1 ±61,03	8,7 ±1,57	16,73 ±2,19	351,2 ±32,53	18,29 ±0,66
Colon	96,56 ±8,12	1000 ±37,23	10,58 ±1,57	17,08 ±1,92	335 ±53,94	17,09 ±1,11
Colon				10,81 ±1,3	151,29 ±39,34	12,2 ±1,24

**4. táblázat** A ganglionok denzitása (ganglion/mm<sup>2</sup>), a NADPH-d-pozitív neuronok denzitása (nitrerg neuron/mm<sup>2</sup>) és a nitrerg neuron/ganglion arány a 13. és 19. embrionális napon a csirke PM-ben, a bélcső teljes hosszában. Az adatok mint átlag±SD szerepelnek a táblázatban.

A 13 és 19 napos embriók esetében a kvantitatív vizsgálatokat a bél teljes hosszára kiterjesztettük (4. táblázat, 8. ábra). A 13. embrionális napon a ganglionok denzitása változatos eloszlást mutatott a bél hossz tengelye mentén (4. táblázat, 8.A ábra). Az ileum kivételével minden bélszakasz között szignifikáns különbség volt a ganglionális denzitásban. Kiugróan magas denzitást találtunk a jejunum orális szakaszán és az ileum



analis végén, míg a jejunum aboralis területén kevés gangliont figyeltünk meg. A 19. embrionális napra a ganglionok denzitása csökkent a 13. naphoz képest. Ekkor a ganglionok eloszlása egyenletes volt az egész bélben. A duodenum és a vastagbél területén szignifikánsan kevesebb gangliont találtunk, mint az azokkal szomszédos területeken.



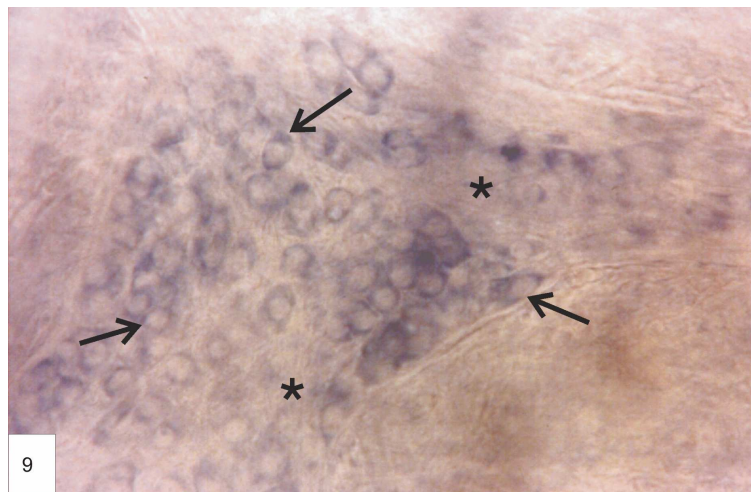
**8. ábra** A grafikonok a ganglionok denzitását (A), a nitroerg neuronok denzitását (B) és a nitroerg neuron/ganglion arányt (C) ábrázolják a bél teljes hosszában 13 és 19 napos csirkeembriókban. A ganglionok és a nitroerg neuronok eloszlása a 13 napos embriókban szignifikáns különbségeket mutatott, míg a 19. napon a ganglionok területi eloszlása egyenletes volt. Az egy ganglionra eső nitroerg neuronok száma a 19. inkubációs napra minden bélszakaszban szignifikánsan megnőtt, az oralis jejunumban és az analis ileumban megkétszereződött.

A 13. embrionális napon a nitrerg neuronok denzitása hasonló mintázatot mutatott a ganglionok denzítés mintázatával (4. táblázat, 8.B ábra). A distalisabb jejunum területén a ganglionok alacsony denzítésének megfelelően a nitrerg neuronok denzitása is alacsony volt. Szignifikáns különbségek csak a jejunum és a jejunummal szomszédos szakaszok közt mutatkoztak. A nitrerg sejtek eloszlási különbségei az egyes bélszakaszok között a 19. embrionális napra kiegyenlítődték. Szignifikáns különbséget ekkor csak a duodenum és a duodenumtól aboralisan elhelyezkedő terület között, illetve a vastagbél és a vastagbélből oralisan található terület között láttunk. A nitrerg sejtek denzítésének csökkenése a teljes bélben végzett vizsgálatban is tapasztalható volt.

A nitrerg neuron/ganglion arány mind az egyes bélszakaszokban, mind az egyes életkorokban jelentős változást mutatott (4. táblázat, 8.C ábra). A 13. embrionális napon a duodenumban, a jejunumban és a vastagbélben magasabb, míg a jejunum oralis részén és az ileumban alacsonyabb volt a nitrerg neuron/ganglion arány. A 19. embrionális napra a jejunum oralis részén és az ileumban magas nitrerg neuron/ganglion arányt számoltunk, míg a vastagbélben az arány megegyezett a 13. embrionális napon számolt értékkel.

#### 4.2. Az összneuronszám változásai a kikelés előtti csirkeembrióban és frissen kikelt csirkében

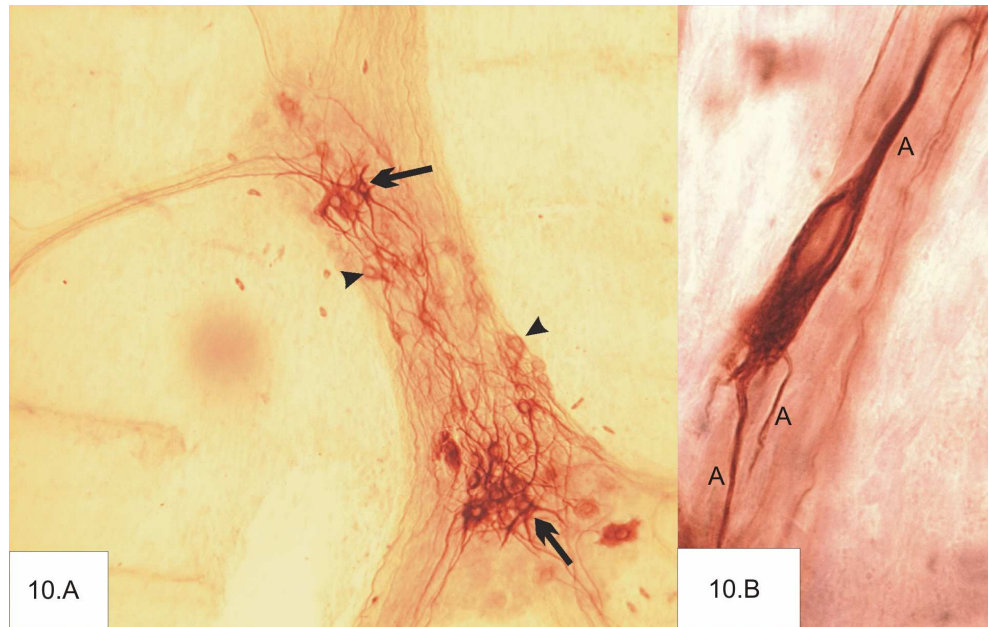
Mind a kuprolin kék, mind a neurofilament immunfestés nagy specificitással jelölte a myentericus neuronokat (9-11. ábra). A kuprolin kék elsősorban a neuronális sejttesteket festette, míg a neuronális nyúlványok és a bélfal egyéb szövetelemei, úgy mint a gliasejtek, simaizomzat vagy erek festetlenek maradtak (9. ábra). A kuprolin kék festés homogén neuronális jelölést eredményezett, így lehetővé tette korrekt kvantitatív vizsgálatok végzését.



**9. ábra** A 4 napos csirke belének distalis vékonybél szegmenséből készített wholemount preparátum kuprolin kék hisztokémiai festés után. A neuronális sejttestek jól jelölődtek és a körvonalaik könnyen kivehetők (nyíl). A neuropil régió (csillag) nem festődött (x670).

Az NF által megjelölt populáció morfológiailag változatosnak bizonyult és a neuronális nyúlványok intenzív jelölődése miatt nehéz volt az egyes neuronokat elkülöníteni egymástól (10. ábra). Az NF festés elsősorban uniaxonalis, multidendriticus neuronokat, néhány esetben pedig adendriticus neuronokat is jelölt. A

sejtméret alapján az NF-pozitív idegsejtek két csoportot képeztek. A nagyobb sejttessel rendelkezők perikarion területe átlagosan  $350 \mu\text{m}^2$ , a kisebbeké  $170 \mu\text{m}^2$  volt.

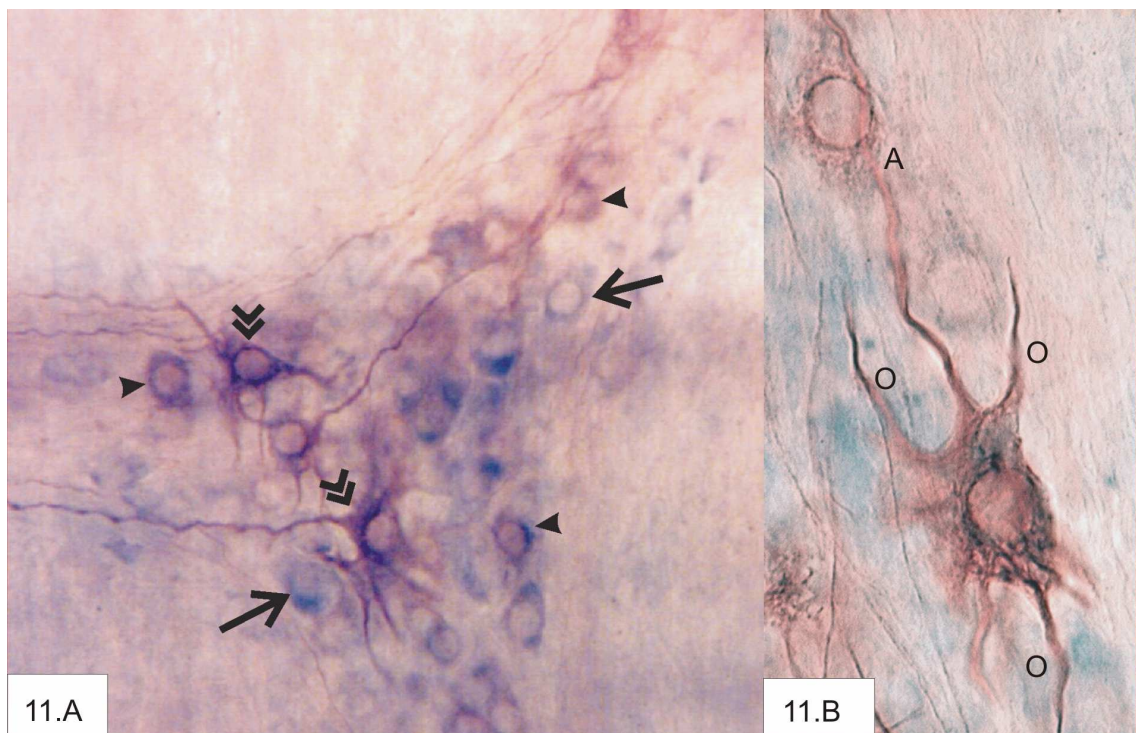


**10.A ábra** A 7 napos csirke belének középső vékonybél szegmenséből készített wholemount preparátum neurofilament immuncitokémiai festés után. A festés kisebb (nyílhegy) és nagyobb méretű neuronokat (nyíl) is jelölt (x670). **10.B ábra** Sötéten festődött sima felszínű és több hosszú nyúlvánnyal (A) rendelkező idegsejt (x1150).

A két markerrel végzett kettősjelölés során láthatóvá vált, hogy a ganglionokon belül a neuronoknak nagy hányada csak kuprolin késsel festődött (11. ábra). A kettősfestésből származó adatok nem voltak homogének, így ANOVA elvégzése nem volt lehetséges. Szemikvantitatív vizsgálataink kiderítették, hogy a myentericus neuronoknak csupán mintegy 30-35%-a volt kettősen jelölt, a neuronoknak 65-70%-a kizárólag kuprolin késsel jelölődött.

A kvantitatív analízis során a ganglionok denzitását, a neuronok denzitását és az egy ganglionra eső összneuronszámot vizsgáltuk (5. táblázat, 12. ábra). Az analízis során kiderült, hogy a 19. embrionális napon a ganglionok denzitása a vékonybél

középső és distalis részében nagyobb, mint a vékonybél proximalis részében vagy a vastagbélben (12.A ábra, 5. táblázat). A ganglionok denzitása a kikelést követő első hét során minden vizsgált szegmensben szignifikánsan ( $p < 0,001$ ) csökkent, kivéve a kikelés utáni 2-4. nap közti időszakot. A kikelés utáni 7. napon a különböző bélszakaszok ganglionális denzitásában nem volt szignifikáns különbség.



**11.A ábra** A 7 napos csirke belének distalis vékonybél szegmenséből készített wholemount preparátum kuprolin kék hisztokémiai és neurofilament immunocitokémiai kettős festés után. A neurofilament immunfestés intenzíven jelölt nagy méretű neuronokat (kettős nyílhegy). Néhány neuron mindkét markerrel jelölődött (nyílhegy). Számos neuront csak a kuprolin kék festés jelölt meg (nyíl) (x670). **11.B ábra** Egy hosszú (A) és több rövid nyúlvánnyal (O) rendelkező nagy méretű immunjelölt neuron (x1150).

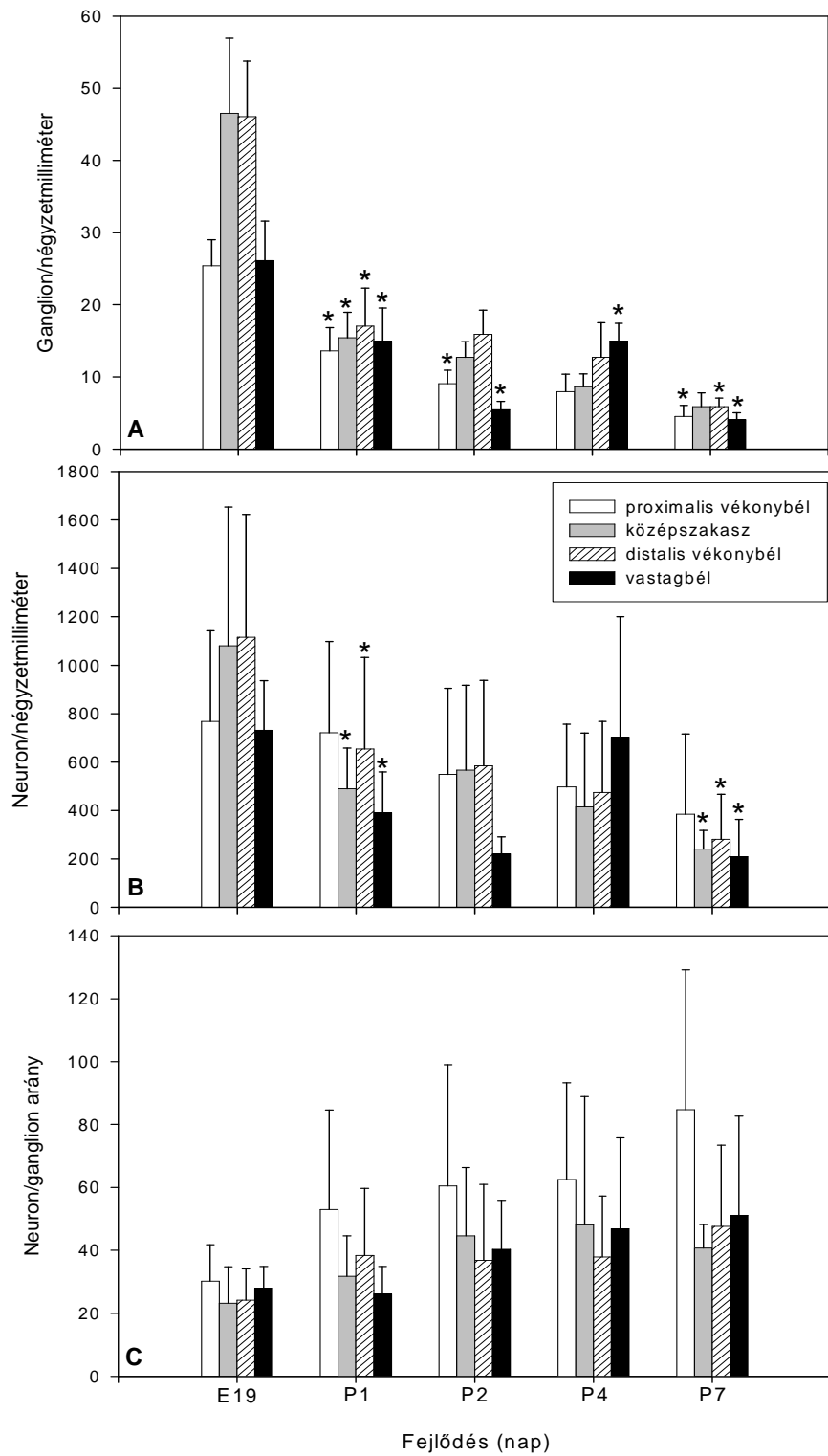
A neuronok denzitása a 19. embrionális nap és a kikelést követő 1. valamint a 4. és 7. nap között szignifikánsan csökkent ( $p < 0,001$ ) (5. táblázat, 12.B ábra). A kikelést követő 1-2. és 2-4. nap között a neuronok denzitásának csökkenése nem volt szignifikáns.

	Proximalis vékonybél			Középső vékonybél		
	Ggl./ mm <sup>2</sup> ± SE	Neuron/ mm <sup>2</sup> ± SE	Neuron/ ggl. ± SE	Ggl./ mm <sup>2</sup> ± SE	Neuron/ mm <sup>2</sup> ± SE	Neuron/ ggl. ± SE
<b>E19</b>	25,42 ± 3,6	767,68 ± 374,6	30,2 ± 11,6	46,54 ± 10,4	1079,73 ± 573,2	23,2 ± 11,6
<b>P1</b>	13,62 ± 3,2	721,86 ± 375,3	53 ± 31,6	15,44 ± 3,5	489,45 ± 168,1	31,7 ± 12,9
<b>P2</b>	9,08 ± 1,9	549,34 ± 355,2	60,5 ± 38,5	12,71 ± 2,2	566,87 ± 349,9	44,6 ± 21,7
<b>P4</b>	7,95 ± 2,5	496,88 ± 259,7	62,5 ± 30,8	8,63 ± 1,8	415,1 ± 305	48,1 ± 40,8
<b>P7</b>	4,54 ± 1,5	384,54 ± 331,4	84,7 ± 44,5	5,9 ± 1,9	240,13 ± 77,7	40,7 ± 7,6

	Distalis vékonybél			Vastagbél		
	Ggl./ mm <sup>2</sup> ± SE	Neuron/ mm <sup>2</sup> ± SE	Neuron/ ggl. ± SE	Ggl./ mm <sup>2</sup> ± SE	Neuron/ mm <sup>2</sup> ± SE	Neuron/ ggl. ± SE
<b>E19</b>	46,08 ± 7,7	1115,14 ± 507,5	24,2 ± 9,9	26,11 ± 5,5	731,08 ± 205	28 ± 6,9
<b>P1</b>	17,03 ± 5,3	653,95 ± 377,7	38,4 ± 21,3	14,98 ± 4,6	390,98 ± 167,8	26,1 ± 8,8
<b>P2</b>	15,89 ± 3,4	684,75 ± 352,2	36,8 ± 24,2	5,45 ± 1,2	219,64 ± 71,2	40,3 ± 15,5
<b>P4</b>	12,71 ± 4,8	474,51 ± 294	37,9 ± 19,4	14,98 ± 2,4	702,56 ± 497,3	46,9 ± 28,9
<b>P7</b>	5,9 ± 1,2	280,84 ± 186,2	47,6 ± 25,9	4,09 ± 1	208,99 ± 154	51,1 ± 31,6

**5. táblázat** A ganglionok denzitása, neuronok denzitása és az egy ganglionban található neuronok száma a 19 napos és az 1, 2, 4 és 7 napos csirke proximalis, középső és distalis vékonybelében valamint vastagbelében. Az adatok mint átlag±SE szerepelnek.

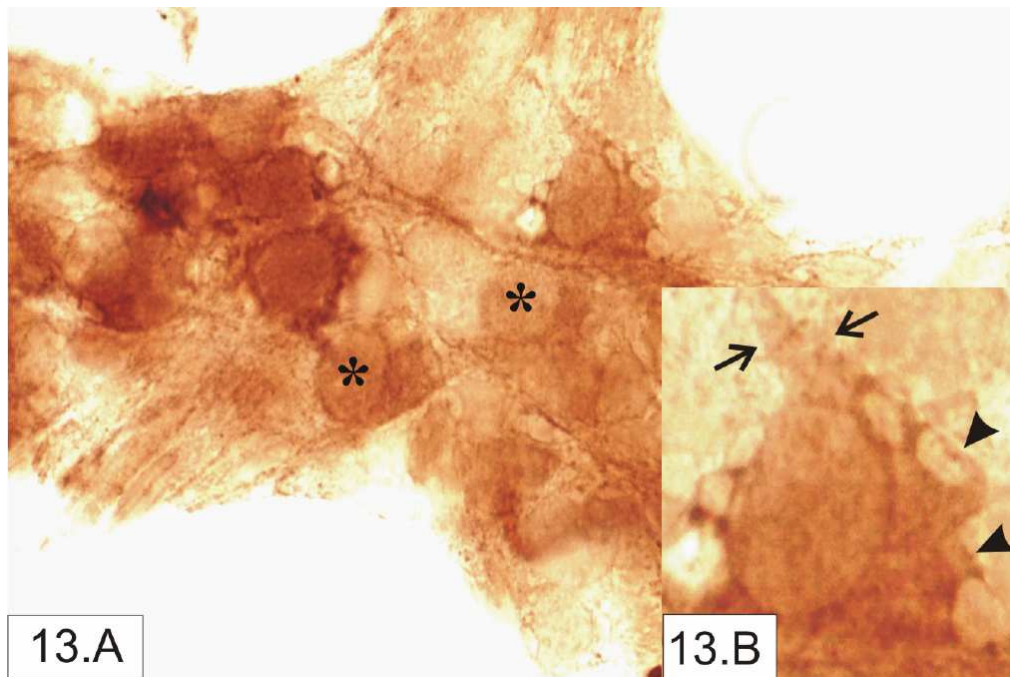
Az egy ganglionra eső átlagos neuronszám mindvégig növekedő tendenciát mutatott. A 19. inkubációs nap és a kikelést követő 2. nap között minden szegmensben szignifikánsan ( $p < 0,001$ ) megnőtt (5. táblázat, 12.C ábra). A kikelést követő 1. nap után a proximalis vékonybélben a neuron/ganglion arány szignifikánsan nagyobb volt, mint a többi három szegmensben.



**12. ábra** A ganglionok denzitása (A), neuronok denzitása (B) és az egy ganglionra eső neuronszámot (C) ábrázoló oszlopdiaagramok a proximalis, középső és distalis vékonybélben valamint a vastagbélben 19 napos csirkeembrió és frissen kikelt 1, 2, 4 és 7 napos csirke PM-ben. Az adatok mint átlag±SE szerepelnek.

### 4.3. A fejlődő humán bélidegrendszer glutamáterg rendszerének vizsgálata

Az anti-glutamát antitest specifikusan jelölt számos myentericus neuront a humán magzati PM-ben (13. ábra). A festés intenzíven jelölte mind a neuronális sejttesteket, mind a neuronok nyúlványait, ami lehetővé tette a glutamáterg neuronok morfológiai osztályozását. Szemikvantitatív vizsgálataink azt mutatták, hogy a glutamáterg neuronok többsége, mintegy 80%-a nagyobb sejttesttel és lamelláris dendritekkel rendelkezett, míg a neuronok 20%-a kisebb sejttestű és sima felszínű volt (6. táblázat).

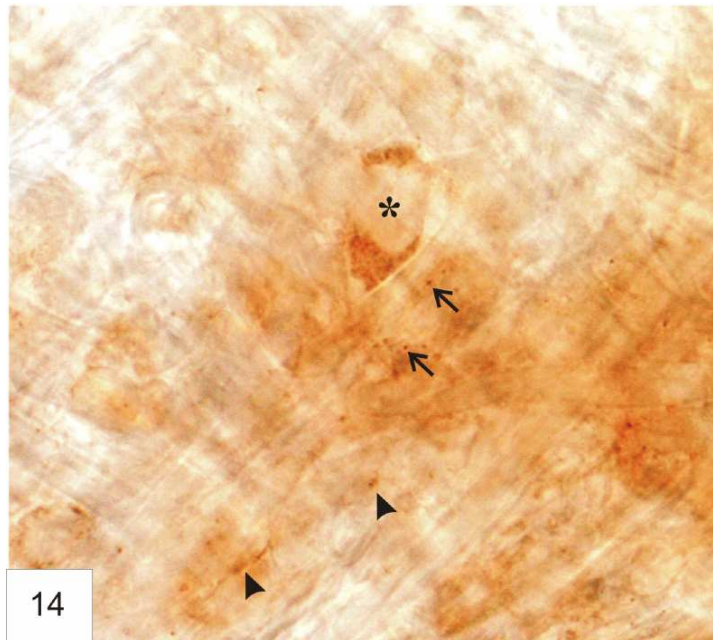


**13.A ábra** Glutamát-immunreaktív neuronok és nyúlványaik egy humán magzati myentericus ganglionban. A glutamáterg neuronok kis hányada sima felszínű (csillag) (x670). **13.B ábra** Számos lamelláris dendrittel (nyílhegy) és egy axoneredéssel (nyíl) rendelkező glutamáterg myentericus neuron (x1150).



Immunreaktivitás	Immunreaktív sejtek száma/mm <sup>2</sup>
Glutamát	320
Glu - nagy perikarion	256
Glu - kis perikarion	64
NR1 alegység	160
VIP	60

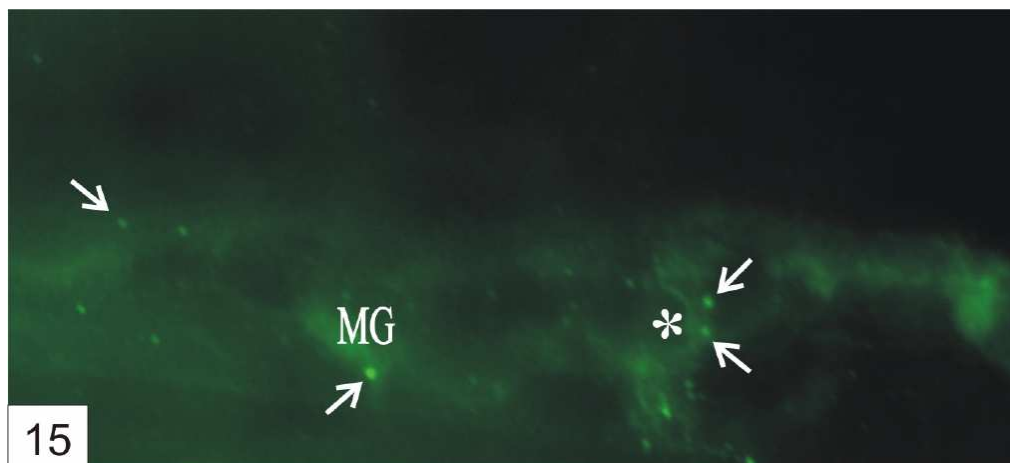
**6. táblázat** A bélfal egy mm<sup>2</sup>-ére eső immunreaktív sejtek száma. A glutamáterg neuronok nagy többsége (80%) nagy perikarionnal, míg kisebb része (20%) kis, sima felszínű perikarionnal rendelkezett. A glutamáterg neuronokhoz képest az NR1- és VIP-pozitív neuronokból sokkal kevesebb található a fejlődő humán PM-ben.



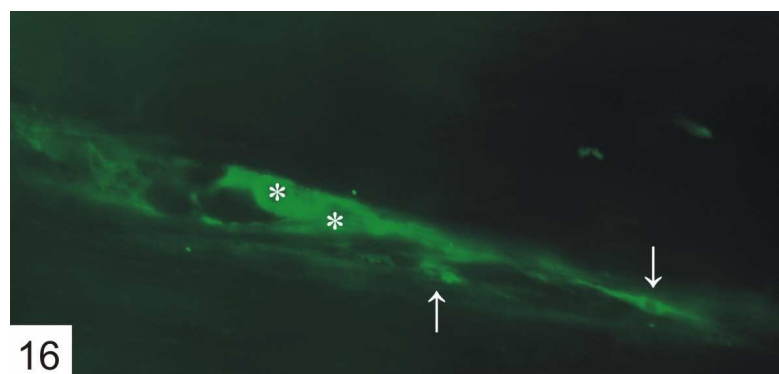
**14. ábra** NMDA receptor NR1 alegység-immunpozitív neuronok a humán magzati vékonybél egy myentericus ganglionjában. Az immunreaktív szemcsék elsősorban a sejt felszínen (nyíl) és a neuronális nyúlványokon (nyílhegy) helyezkednek el. Néhány sejtben az immunreaktív szemcsék a citoplazmában koncentrálnak (csillag) (x670).

Az NMDA receptor NR1 alegységének C-terminális része ellen termelt antitest szintén nagy szelektivitással jelölt myentericus neuronokat (14. ábra). Az NR1 immunreaktivitás szemcsés képet mutatott, főleg sejt felszíni lokalizációval, azonban a szemcsék néha citoplazmatikusan is megfigyelhetők voltak. Az NR2B-immunpozitív

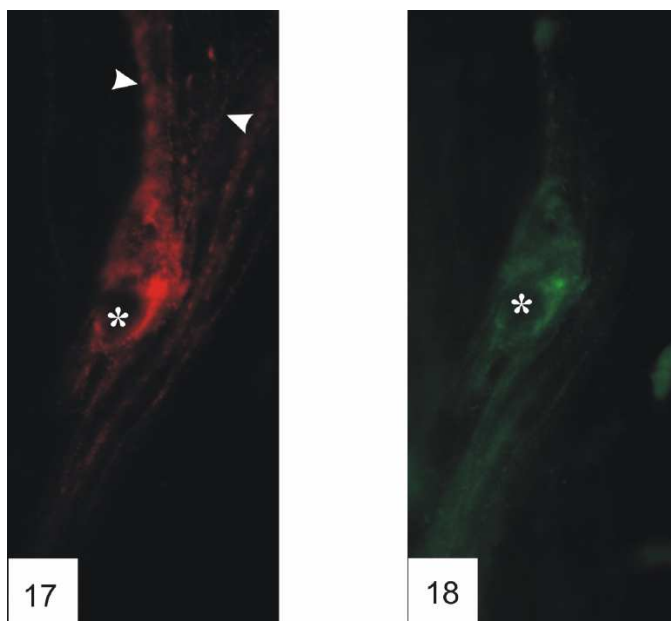
granulumok gyakran láthatóak voltak a myentericus neuronok citoplazmájában és felszínén is (15. ábra), ugyanakkor az NR2A alegység C-terminális része ellen termelt antitest kizárólag citoplazmikus festést eredményezett (16. ábra). Az NR2A festés nemcsak neuronokat, hanem számos kisebb, a Cajal-féle interstitialis sejtekre emlékeztető sejtet is festett (16. ábra).



**15. ábra** Humán magzati vékonybélből készített paraffinmetszet az NMDA receptor NR2B alegységre végzett immunfestés után. A myentericus ganglionra (MG) diffúz festődés jellemző. A diffúz festődés mellett sejt felszínén lokalizált jelölés (nyíl) is megtalálható. A csillag egy entericus neuron sejtmagját jelöli (x670).

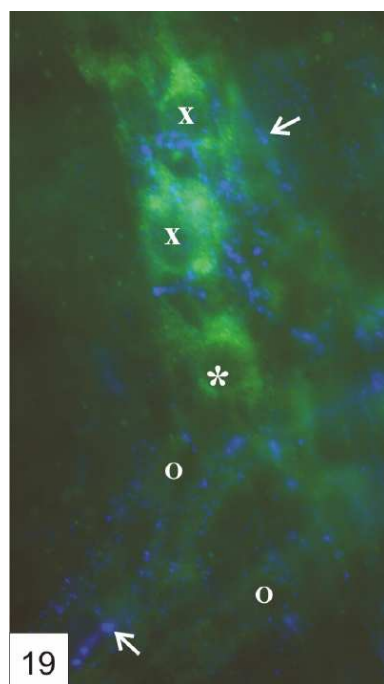


**16. ábra** Humán magzati vékonybélből készített paraffinmetszet az NMDA receptor NR2A alegységre végzett immunfestés után. Nemcsak myentericus neuronok (csillag), de Cajal-féle interstitialis sejtekre emlékeztető sejtet (nyíl) is megfestődtek (x670).

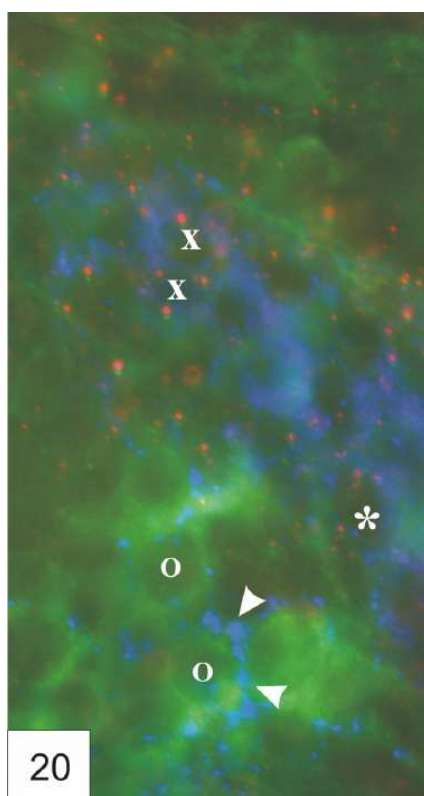


**17. ábra** VIP-immunpozitív myentericus neuron. Mind a sejttest (csillag), mind a nyúlványok (nyílhegy) intenzív VIP-pozitivitást mutatnak (x670).

**18. ábra** A 17. ábrán látható neuron NMDA receptor NR1 alegység-immunjelölés után. A sejttest (csillag) NMDA NR1 alegységre pozitív, míg a nyúlványok festetlenek maradtak (x670).



**19. ábra** NOS/NMDA receptor NR1 alegység kettős fluoreszcens immunfestés humán magzati vékonybélből készített wholemount preparátumon. Az NR1-pozitív szemcsés jelölés (nyíl) szétszóródva helyezkedik el NOS-pozitív (X) és nem NOS-immunpozitív sejtek (O) körül. Bizonyos NOS-pozitív neuronok (csillag) nem rendelkeznek NMDA NR1 alegység-pozitivitással (x400).



**20. ábra** VIP/NOS/NMDA receptor NR1 alegység hármasszínű fluoreszcens immunfestés humán magzati vékonybélből készített wholemount preparátumon. Az NR1-immunpozitivitás elsősorban VIP-pozitív neuronális sejtestek (X) körül látható. A tisztán NOS-pozitív neuronok (O) körül VIP-pozitív varikozitások (nyílhegy) figyelhetők meg. A NOS-pozitív neuronok ritkán rendelkeznek NR1 pozitivitással. A NOS/VIP kettősjelölt neuronok (csillag) körül NR1-pozitív szemcsék is megfigyelhetők (x240).

A myentericus neuronok egy kis csoportja VIP-immunpozitivitást mutatott (17. és 20. ábra, 6. táblázat). A VIP-pozitív neuronok kis hányada NMDA NR1 alegység (17. és 18. ábra) és NOS-immunreaktivitást is mutatott (20. ábra). A NOS-immunpozitív neuronok gazdag glutamaterg (19. ábra) és VIPerg innervációval rendelkeztek (20. ábra). A tisztán NOS-pozitív neuronok csak ritkán expresszáltak NMDA NR1 alegységet, míg a VIP/NOS kettősjelölt myentericus idegsejtek körül gyakran található NMDA receptorok.

## **5. Eredmények megbeszélése**

### **5.1. A bélidegrendszer nitrerg neuronjainak vizsgálata fejlődő csirkeembrióban**

Az ncNOS kifejeződése az embrionális fejlődés során dinamikusan változik, így ideális paramétere az olyan kutatásoknak, amelyek az ENS fejlődése során a regionális változásokat vizsgálják (Belai és mtsai. 1995, Van Ginneken és mtsai. 1998, Timmermans és mtsai. 1999). Számos közlemény szerint a NADPH-d hisztokémiai festés megbízhatóan használható az ncNOS-immunpozitív sejtek kimutatására emlős (Young és mtsai. 1993, Timmermans és mtsai. 1994) és madár ENS-ben (Balaskas és mtsai. 1995a). Miután csirke ENS-ben részletes regionális vizsgálatot eddig nem végeztek, kérdéses volt, hogy a korábban nyert adatok mennyire általánosíthatók a gerinces állatok ENS-ében. Így munkánk célja az volt, hogy megállapítsuk, milyen kvalitatív és kvantitatív változások következnek be csirke ENS-ben a PM fejlődése során. Kísérleteink során elsőként csak az embrionális belek három szakaszát: a proximális és distális vékonybél valamint a vastagbél szakaszait vizsgáltuk a 12., 13., 14. és 19. inkubációs napon. Vizsgálatainkban azért választottuk a 12. embrionális napot a legkorábbi stádiumnak, mert korábbi kutatásokból tudtuk, hogy madarakban ez az a fejlődési állapot, amikor a neuronok a bél teljes hosszában ganglionált plexusokba rendeződnek (Boros és mtsai. 1994, Balaskas és mtsai. 1995). Másrészt ismert az is, hogy a nitrerg neuronok gyakran kotranszmitterként használják a VIP-et (Furness 2000, Mirabella és mtsai. 2000) és a VIPerg neuronpopuláció első megjelenése szintén a 12. embrionális nap környékére tehető (Parisi Salvi és mtsai. 2004). Az utolsó embrionális vizsgálati nap a kikelést közvetlenül megelőző 19. nap volt.

Azok a vizsgálatok, amelyek csak egy-egy bélszakaszt érintettek hasznos adatokat szolgáltatottak, de nem adtak kielégítő információt az egész ENS fejlődéséről. További kísérleteink során ezért a 13 és 19 napos embrionális csirke beleket teljes hosszukban megvizsgáltuk. Mivel a 19 napos embriók bélcsatornája hosszabb, mint a 13 napos embrióké, vizsgálataink során a 19 napos bél esetében 8, a 13 napos bél esetében 7 szakaszt különítettünk el.

A PM morfológiai érése két irányból, a duodenum és a vastagbél felől indult el, a plexus általános képe ezen a két bélszakaszon tűnt először a kifejlett MP-hez hasonlóknak. A fejlődés kezdetén a ganglionok egymáshoz közel helyezkedtek el, az internodális szegmentek rövidek voltak, nitrerg neuronok a ganglionokon kívül, az összekötő ágakban is előfordultak. A morfológiai érés során a ganglionok távol kerültek egymástól, az internodális szegmensek megnyúltak. Az érés előrehaladtával a nitrerg neuronok csak kivételesen fordultak elő az internodális szegmentekben. A morfológiai érésben a distalis vékonybél szegmens egy napos késést mutatott a proximalis szakaszhoz képest. A bélfal növekedése miatt az egy területegységre jutó ganglionok száma (ganglionok denzitása) és ezzel a nitrerg neuronok denzitása is szignifikánsan csökkent a 12. és 19. embrionális nap között. A ganglionokhoz hasonlóan a NADPH-d pozitív neuronok denzitása is két irányból induló csökkenést mutatott. A proximalis vékonybélben, és a vastagbélben már a 12-13. embrionális napon szignifikáns sejtszámcsökkenést figyeltünk meg, míg a distalis vékonybél területén ekkor még sem kvalitatív, sem kvantitatív változást nem tapasztaltunk. Ezen eredmények alapján megállapítottuk, hogy a proximalis vékonybél és vastagbél területén előbb történtek meg a szignifikáns változások, mint a distalis vékonybélben. A 19. embrionális napra a vizsgált bélszakaszokon a ganglionok denzitása a 12. napi értéknek körülbelül egyötödére csökkent, és a PM a bél teljes hosszában érettnek tűnt. A nitrerg

neuron/ganglion arány a 14. embrionális napig nem mutatott változást a vizsgált bélszakaszokon, majd az inkubációs időszak végére ez az arány megkettőződött.

Sertésben is hasonló tendenciát figyeltek meg, de ott a PM nitrerg populációjának megduplázódása csak a posztnatális időszakban történt meg (Van Ginneken és mtsai. 1998). A megemelkedett NO-mennyiség, amelyet a megnövekedett számú nitrerg neuronok termelnek, más neuronok végső érésének (Ogura és mtsai. 1996) vagy az izomzat növekedésének szabályozásában játszhat szerepet (Blennerhassett és Louressen 2000). A kikeléshez közeli időszakban megnövekedett NO termelés oka az lehet, hogy a posztnatális élet során fokozottabb gátló innervációra van szükség, mint embrionális állapotban (Van Ginneken és mtsai. 1998, Jarvinen és mtsai. 1999). Kvantitatív vizsgálataink azt mutatták, hogy a ganglionok és nitrerg neuronok denzitása a bélfal növekedésének köszönhetően a 12. és 19. hét között egyötödére esett vissza, ugyanakkor a nitrerg neuron/ganglion arány megkétszereződött. A nitrerg neuron/ganglion arány növekedése a neuronok denzitásának csökkenése ellenére képes biztosítani a növekvő izomzat fokozódó NANC innervációs igényét.

Az embrionális csirke bélen végzett kvalitatív és kvantitatív vizsgálataink eredményei szerint nemcsak a különböző sejtpopulációk, de maga a PM is két irányból, a bél oralis és analis végéről a középrész felé haladva fejlődik. Erre utal az, hogy a 19. embrionális napon a duodenum és vastagbél már fejlettebb, mint a bél középső területei, hiszen a duodenumban és a vastagbélben ekkor már mind a ganglionok, mind a nitrerg neuronok denzitása kisebb. A két irányból történő fejlődést azok az eredmények is támogatják, melyek szerint a nitrerg neuron/ganglion arány megnövekedése, hullámszerű mintázatot követve, két iniciációs helyről (jejunum és distalis ileum) indul el és a középső területek (distalis jejunum és proximalis ileum) felé halad. Ez azt jelentheti, hogy a kolonizáció (LeDouarin 1982, Gershon és mtsai. 1994, Gershon 1998,

Taraviras és Pachnis 1999) valamint a VIPerg és nitrerg sejtek fejlődése (Epstein és Poulsen 1991, Boros és mtsai. 1994, Balaskas és mtsai. 1995b) mellett a PM és a bélfal morfogenezise is eltérő szabályozás alatt áll a különböző bélszakaszokban. A csirke ENS fejlődésének regionális jellegére rámutató eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a bél hossz tengelye mentén regionálisan kifejeződő Hox gének (Beck és mtsai. 2000) nemcsak a bélcső egyes szakaszainak a kialakításában, hanem az ENS végső morfogenezisében is fontos szerepet játszanak.

A nitrerg neuronok kvantitatív vizsgálatainak eredményeit összefoglalva: a csirke ENS nitrerg neuronjai a 12-19 embrionális nap során bélszakaszspecifikus változásokat mutatnak. A csirke ENS nitrerg rendszerében hullámszerű, a bélcsatorna két iniciációs pontjáról induló kvalitatív és kvantitatív változások történnek. Ez az eredmény megerősíti azt, hogy az ENS és a bélfal más komponensei mellett a nitrerg rendszer is két irányból fejlődik.



## 5.2. A teljes neuronszám változásai kikelés előtti és frissen kikelt csirkében

Jelen vizsgálatainkat a kikelést közvetlenül megelőző és az azt közvetlenül követő fejlődési stádiumú csirkéken végeztük. Választásunk azért esett erre az időszakra, mert a kikelés előtt lévő és az utána következő időszak fiziológiás követelményeiben nagy mértékben különbözik egymástól. A kikelés előtt a csirkeembrió a szikból táplálkozik, onnan a tápanyagokat a szikkeringésen keresztül veszi fel. Ezzel szemben a kikelés után a csirke a szikból való táplálkozás helyett használni kezdi emésztőrendszerét. Korábbi kutatásokból ismert volt, hogy a korai posztnatális élet során valóban nagy változások következnek be az ENS felépítésében (Van Ginneken és mtsai. 1998, Wester és mtsai. 1998, Schäfer és mtsai. 1999, Timmermans és mtsai. 1999), ezért végeztük kísérleteinket 19 napos csirkeembriókon és a kikelés utáni hétről származó csirkéken.

A teljes neuronszám meghatározására kuprolin kék hisztokémiai és neurofilament immuncitokémiai festést végeztünk. Mindkét marker szelektíven jelölte a myentericus neuronokat a vizsgált bélszakaszokban. Mivel a kuprolin kék hisztokémiai festés után az izomsejtek, a gliasejtek és a neuronális nyúlványok nem festődtek, a jelölt neuronok számolását könnyen és nagy pontossággal lehetett végezni. Az NF-immunfestés után a neuronális nyúlványok és a ganglionális neuropil is erősen jelölődött, ami megnehezítette a neuronok számolását. A két festést egyszerre alkalmazva (Holst és Powley 1995, Van Ginneken és mtsai. 1999) mindkét jelölés intenzívebbé vált és a kék-barna szíkontraszt lehetővé tette az NF-pozitív neuronok morfológiai osztályozását. A  $350 \mu\text{m}^2$  területű NF-pozitív neuronok leggyakrabban a Dogiel által leírt I-es vagy III-as típusba tartoztak, ritkábban Dogiel II-es morfológiával rendelkeztek. Legtöbbjük multidentricus uniaxonalis típusú több vagy kevesebb nyúlvánnyal rendelkezett (rendre Dogiel I-es és III-as neuronok), míg kisebb hányaduk dendriticus vagy adendriticus

multiaxonalis neuron volt (Dogiel II-es típus) (Dogiel 1899, Brehmer és mtsai. 1999a). Az NF immuncitokémiai jelölés jó technikának bizonyult a neuronális morfológia meghatározására, de nem volt alkalmas kvantitatív vizsgálatok végzésére. Az NF festésből származó adatok varianciája nem volt homogén, ezért ANOVA-t nem tudunk végezni, így ezekből a vizsgálatokból csak szemikvantitatív következtetéseink vannak. A kuprolin kék-NF kettős festésből származó szemikvantitatív vizsgálatok kimutatták, hogy a neuronok nagy hányada csak kuprolin késsel jelölődött. Ez a populáció a teljes myentericus neuronszámnak körülbelül a 65-70%-át tette ki. Ez az eredmény rámutatott arra, hogy az NF jelölés nem használható pán-neuronális markerként (Björklund és mtsai. 1984, Eaker 1997, Brehmer és mtsai. 1999b), mivel jelentősen alábecsüli a PM-ben található összes neuron számát. A tény, hogy az NF festés nem jelölte a kuprolin késsel festett neuronok nagy részét, valószínűleg azzal magyarázható, hogy a neuronok számos különböző NF fehérjét expresszálnak (Eaker 1997, Herrmann és Aebi 2000). Vizsgálatainkban kizárólag a 200 kDa-os NF elleni antitestet használtunk, így az olyan neuronok, amelyek más NF típusokat fejeznek ki, jelöletlenek maradhattak.

Az NF festés mellett a NADH-d festést (Gabella 1987, Young és mtsai. 1993), a konstitutív nukleáris onkoproteinek (c-Myc, c-Fos) (Parr és Sharkey 1994) és a PGP 9.5 (protein gene product 9.5) neuronális ubiquitin (Timmermans és mtsai. 1999) elleni immuncitokémiai festéseket tartották az összneuronszám meghatározására alkalmas módszernek. Az ismert technikák közül ma már csak a kuprolin kék hisztokémiai festést és a HuC/D immuncitokémiai festést alkalmazzák mint megbízható pán-neuronális jelölést (Phillips és mtsai. 2004).

A kuprolin kék-pozitív idegsejtek számolásából származó adatok statisztikai értékelése azt mutatta, hogy a 19. inkubációs napon mind a ganglionális, mind a neuronális denzitás értékek szignifikánsan nagyobbak voltak a középső és distalis

vékonybél szakaszokon, mint a proximális vékonybélben vagy a vastagbélben. A kikelés során (19. inkubációs nap és a kikelést követő 1. nap között) bekövetkező fejlődéssel a denzitás értékek csak az előbb említett középső szakaszokon csökkentek szignifikánsan. Az ezt követő fejlődés során, a kikelés utáni 2-7. nap közötti időszakban a denzitásértékek a bélizomzat növekedésének megfelelően változtak (Fekete és mtsai. 1996). A proximális vékonybélben és a vastagbélben található alacsonyabb denzitásértékek valószínűleg megfelelnek e bélszakaszok előrehaladottabb fejlettségi fokának. A neuronok denzitásának vagy a ganglionok denzitásának regionális különbségeit más fajok ENS-ében is leírták (Karaosmanoglu és mtsai. 1996, Schafer és mtsai. 1999).

A gangliononkénti neuronszám minden vizsgált szegmensben növekedő tendenciát mutatott a fejlődés során, de a változások dinamikája a különböző bélszakaszokban eltérő volt. A 19. embrionális napon az összneuron/ganglion arány hasonló volt minden szegmensben. A 19. embrionális nap és a kikelés utáni 2. nap között csak a proximális vékonybélben tapasztaltunk szignifikáns növekedést. A kikelést követő 7. napra a proximális vékonybél szakaszban háromszorosra növekedett a neuronok száma egy-egy ganglionban a 19. inkubációs napon számolt értékhez képest. A többi vizsgált bélszakaszban a gangliononkénti idegsejtszám csaknem megkétszereződött. A teljes neuronszám megnövekedése felveti a kérdést, hogy vajon milyen forrásból származhatnak új entericus neuronok. A posztnatális központi idegrendszerben történő *de novo* neurogenesis jelensége széles körben elfogadottá vált az utóbbi évtized során (Gross 2000) és úgy tűnik, a környéki idegrendszernek is megvannak a saját forrásai új neuronok létrehozására (Silva és mtsai. 2000). Az entericus felnőttkori neurogenesis adaptációs és pathogenetikus folyamatokkal hozható kapcsolatba (Genua és mtsai. 2002). A részleges bélelzáródás, intestinalis gyulladás és

az entericus neuronok benzalkonium-kloriddal való kiirtása (Cracco és Filogamo 1993) a myentericus neuronok hipertrophiájához vagy a teljes neuronszám helyreállításához vezet. Kimutatták, hogy a nestin fehérjét (neuronális progenitor-specifikus fehérje) expresszáló sejtek megtalálhatók a posztnatális myentericus ganglionokban (Silva és mtsai. 2000), valamint azt is, hogy ezek a prekursorok képesek idegsejteké differenciálódni (Sharkey és Parr 1996). Ezen adatok alapján feltételezzük, hogy a jelen vizsgálatban tapasztalt neuronszám növekedés mögött legalábbis részben az ENS-ben lejátszódó posztnatális neurogenesis áll. A megszületést követő nagymértékű sejtszám-növekedés a bélfal különböző rétegeinek, elsősorban az izomzatnak egyre növekvő innervációs igényét elégíti ki (Bagyánszki és mtsai. 2002a). Az egy ganglionra eső neuronszám regionális különbségei a különböző bélszakaszok más és más élettani funkcióit (szekréció, felszívás, immunválasz) tükrözi (Karaosmanoglu és mtsai. 1996, Van Ginneken és mtsai. 1998, Jarvinen és mtsai. 1999, Schaffer és mtsai. 1999).

Röviden összefoglalva: a kuprolin kék hisztokémiai festés alkalmas a csirke ENS teljes neuronpopulációjának megjelölésére. A kuprolin kék hisztokémia a neurofilament immuncitokémiai festésnél sokkal hatékonyabban jelöli az entericus neuronokat. A kikelés környékén a csirke ENS teljes neuronpopulációjában régióspecifikus kvantitatív változások történnek. A kikelést követő héten a csirke ENS-ben az entericus neuronok száma megnő, mely valószínűleg a kikelésen túl is folytatódó neurogenesisnek köszönhető.

### 5.3. A fejlődő humán bélidegrendszer glutamáterg rendszerének vizsgálata

A jelen vizsgálat célja az volt, hogy olyan immunhisztokémiai adatokat szolgáltatasson, melyek alátámasztják a glutamát neurotranszmitter funkcióját a humán magzati ENS-ben. Szemikvantitatív becsléseink kimutatták, hogy a glutamátot tartalmazó myentericus neuronok mintegy 80%-a nagy, multidendriticus és uniaxonalis volt. Ez a sejt morfológia legjobban a Dogiel által leírt I-es típussal feleltethető meg. A glutamát-pozitív neuronok 20%-a kisebb méretű volt, sima sejt felszínnel és egy hosszú nyúlvánnyal rendelkezett, ami a Dogiel II-es sejt morfológiára emlékeztetett.

Korábbi kutatások szerint a patkány ENS-ben szinte valamennyi entericus neuron NMDA receptor-pozitívnek bizonyult (Liu és mtsai. 1997), ezzel szemben úgy tűnik, hogy az NMDA receptor-immunreaktivitás eloszlása a humán ENS-ben sokkal korlátozottabb és szelektívebb. Az NR1 és NR2B receptor alegységek sejt felszínén, míg az NR2A, 2C és 2D alegységek mindig a citoplazmában lokalizálódtak. Ez utóbbi alegységek újszülött állatok myentericus neuronjaira jellemzőek (Lynch és Guttmann 2001). Mivel az ionotrópikus receptorok jelátvivő funkciójukat csak a sejt felszínén tudják ellátni (Roche és mtsai. 2001), valószínűsíthető, hogy a fejlődő humán PM-ben az NR1 és NR2B alegységek a glutamáterg neurotranszmisszió mediátorai. A neuronális expresszió mellett Cajal-féle interstitialis sejtekhez (ICC) hasonló sejtekben (Faussone-Pellegrini 1987) lokalizált NR1 kifejeződést is találtunk. Az ICC-k szoros kapcsolatot alakítanak ki az entericus neuronokkal és simaizomsejtekkel, emellett ritmusgeneráló sejtekként is működnek (Horowitz és mtsai. 1999, Sanders és mtsai. 2000), valamint modulálják a neuronok jelátviteli folyamatait is (Ward és mtsai. 2000). Így lehet, hogy az NR2A alegységen keresztüli glutamát szignalizáció az ICC-kre gyakorolt hatásán keresztül vesz részt a bél motilitás szabályozásában.

Szemikvantitatív vizsgálataink azt mutatták, hogy a VIPerg neuronok egy kis hányada, mintegy 10%-a, kap glutamáterg serkentő bemenetet a 18. gesztációs héten. A VIPerg neuronok a PM-ben interneuronok, gátló motoneuronok vagy szekretomotoros neuronok lehetnek (Furness 2000). A VIPerg populáció egy csoportja NOS-t is expresszál, ezek a neuronok gátló motoneuronokként funkcionálnak (Furness 2000). Mivel a VIPerg populáció bizonyos neuronjai NOS enzimet is kifejeznek a humán PM-ben (Keranen és mtsai. 1995, Bagyánszki és mtsai. 2002b, Pimont és mtsai. 2003), így feltételezhető, hogy a glutamát fontos serkentő bemenete ezeknek a gátló motoneuronoknak. Másrészt a glutamát gátló hatást is kifejthet nitrerg neuronokon, amennyiben a jelátvitel nem ionotróp, hanem metabotróp receptorokon keresztül valósul meg (Tong és Kirchgessner 2003). A motilitásra kifejtett hatása mellett a glutamát az embrionális vagy magzati fejlődés során is fontos lehet. Mivel az NMDA NR1 receptoron keresztüli jelátvitel fontos lépés lehet a neuronális fejlődésben (Roche és mtsai. 2001). Központi idegrendszerben ismert, hogy az NR1 aktiváció NOS expresszióhoz vezet (Ayata és mtsai. 1997), így feltételezhető, hogy a glutamát szignalizáció a VIP/NOS-pozitív gátló motoros idegsejtek embrionális fejlődésében is szerepet játszik. Így feltételezzük, hogy a glutamát nemcsak a kifejlett ENS kolinerg neuronjainak működését szabályozza (Giaroni és mtsai. 2003, Tong és Kirchgessner 2003), de a humán foetalis fejlődés során a neuronális fenotípus meghatározásában is szerepe van.

Összefoglalva: a 18 hetes humán magzati ENS tartalmaz glutamát-pozitív neuronokat. A 18 hetes humán magzati ENS-ben szintén megtalálhatók a glutamát-receptív, NMDA receptor-pozitív sejtek. A humán magzati ENS-ben a VIP/NOS kettősjelölt neuronok körül fordul elő legtöbbször az NMDA receptor pozitivitás.

## 6. Összefoglalás

### 6.1. Magyar nyelvű összefoglalás

A bélidegrendszer (ENS) a környéki idegrendszer harmadik, a központi idegrendszertől nagy mértékben független része. Az ENS-t felépítő több millió idegsejtben majdnem az összes ismert ingerületátvivő anyag megtalálható. Nemcsak az ENS anatómiája és neurokémiája, de embrionális fejlődése is eltér a környéki idegrendszer másik két részétől. Az ENS gliális és neuronális elemei meghatározott útvonalak mentén vándorló dúlcélsejtekből származnak. A jelen tézisek alapjául szolgáló kutatásaink első felében a fejlődő csirkét használtuk modellállatként. Később humán magzati anyagon dolgoztunk, melyet az SZTE Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikával folytatott együttműködés keretében kaptuk.

A fejlődő csirkeembrió nitrerg neuronjainak vizsgálatára NADPH-diaforáz hisztokémiai festést alkalmaztunk 12, 13, 14 és 19 napos csirkeembriók belének különböző szakaszaiból készített wholemount preparátumokon (Bagyánszki és mtsai. 2000). Megszámoltuk az  $1 \text{ mm}^2$ -re eső ganglionok és nitrerg neuronok számát majd kiszámítottuk az egy ganglionra eső nitrerg neuronok számát. A 12. és 19. embrionális nap közötti fejlődés során mind a ganglionok mind a nitrerg neuronok denzitása szignifikánsan csökkent. A változások regionális különbségeket mutattak: a csökkenés a vastagbél területén később következett be. A 19 napos embrióban a ganglionok denzitása a 12 napos embrióban mért értéknek az egyötödére csökkent. A nitrerg neuron/ganglion arány a vizsgált időszak alatt dinamikusan változott. A 12-14. embrionális napon az arány hullámszerű mintázatot mutatott, a proximalis

vékonybélben és a vastagbélben magasabb értéket figyeltünk meg, mint a distalis vékonybélben. Ez a mintázat sokkal egyenletesebbé vált a 19. embrionális napra.

A teljes neuronszám változásának vizsgálatára egy kuprolin kék/neurofilament kettősfestéses eljárást dolgoztunk ki, melyet csirke embriók (19. embrionális nap) és fiatal csirkék (kikelés utáni 1., 2., 4. és 7. nap) belének különböző szakaszaiból készített wholemount preparátumokon alkalmaztunk (Román és mtsai. 2001). A kuprolin kék festés szelektíven jelölte meg a neuronális sejttesteket, míg a neuronális nyúlványok és gliasejtek csak gyengén festődtek. A kuprolin kék-pozitív neuronok morfológiailag egységes csoportot alkottak. Ezzel szemben a neurofilament immuncitokémiai festés egy morfológiailag változatos neuronpopulációt jelölt meg. A két markerrel történő kettős festés mindkét festés jelintenzitását fokozta, így lehetővé tette a neurofilament-pozitív neuronok pontos morfológiai jellemzését.

A kuprolin kék-pozitív neuronok számát ANOVA és Tukey-próba alkalmazásával statisztikailag értékeltük. A fejlődés során a neuronok és a ganglionok denzitása is csökkent, míg az egy ganglionra átlagosan eső neuronok száma megnőtt. A vizsgált időszakon belül ezek a változások a különböző bélszakaszokban különböző dinamikával játszódtak le. Az NF-immunfestésből nyert adatok varianciája inhomogénnek bizonyult, így alkalmatlan volt ANOVA-ra. Így ezekből az adatokból csak szemikvantitatív következtetéseket vontunk le, s megállapítottuk, hogy az NF és kuprolin kék kettősjelölt neuronok a teljes neuronpopuláció 30-35 %-át teszik ki.

A szakirodalomban elsőként vizsgáltuk és mutattuk ki a glutamát és NMDA receptorok jelenlétét a humán magzati ENS-ben (Román és mtsai. közlés alatt). Megfigyeltük azt is, hogy a VIPerg neuronoknak egy csoportja, a VIPerg neuronok mintegy 10%-a fejezi ki az NMDA NR1 receptor alegységet.



## 6.2. Summary

The enteric nervous system (ENS) is the third division of the peripheral nervous system and it is highly independent of the central nervous system. It consists of millions of neurons, which signal by means of almost all known neurotransmitters. Not only the structural and neurochemical complexity of the ENS is remarkable, but also its embryonic development. The neural crest-derived precursors of the ENS migrate along different pathways to colonize the gut wall.

In the first part of my research project the developing chicken was used as a model organism. Later on, I have worked with human material, which was obtained from the Department of Gynaecology and Obstetrics of the University of Szeged.

In our study, we used NADPH-diaphorase histochemistry to visualize nitrergic neurons (Bagyánszki et al. 2000). During the development between embryonic day 12 and 19, both the density of ganglia and nitrergic neurons (ganglia or neurons/area) decreased significantly. During the examined period, neuronal density significantly decreased in each gut segment, however, this decrease showed a delay in the colon. In the 19-day-old-embryo, the density of ganglia decreased to 1/5 of the value compared to the 12-day-old-embryo. More interestingly, changes in the neuron/ganglion ratio showed a rather dynamic pattern. At the first three examined developmental stages, the ratio showed a wave-like pattern with higher values in the proximal part of the small intestine and the colon. This pattern became more balanced by embryonic day 19.

Histochemical staining with cuproinic blue and immunostaining against 200 kDa neurofilament (NF) were performed on wholemount preparations made from the proximal, middle, and distal small intestine and the colon (Román et al. 2001). The changes in ganglionic and neuronal densities, and in neuron/ganglion ratio were studied

on embryonic day 19, on posthatching days 1, 2, 4, and 7. Cuproinic blue selectively stained a large number of uniform neurons in the developing myenteric plexus without staining any neuronal processes or glial cells. On the other hand, the NF staining labelled a morphologically rather varied neuronal population with very intense staining in neuronal processes.

Double-staining with cuproinic blue and NF made it also possible to intensify both stainings by the use of the blue-brown contrast, thus allowing an accurate morphological classification of NF-labelled neurons. Double-staining with cuproinic blue and NF revealed that NF staining alone labelled approximately 35% of the total myenteric neuronal population. During development, both the ganglionic and neuronal densities decreased, and the number of neurons per ganglion increased. The quantitative changes took place with different dynamics in different gut segments.

In an additional experiment we investigated the glutamatergic transmitter system in the human fetal ENS. This study has been the first attempt to show the existence of glutamatergic and NMDA-positive neurons in the human fetal ENS (Román et al. submitted). This study revealed neuronal populations that express glutamate and NMDA receptors and also showed that only a small minority (10 %) of the VIPergic neurons express NMDA NR1 receptor subunits.

## 7. Irodalmi hivatkozások

Aicher SA, Hahn B, Milner TA (2000) N-methyl-D-aspartate-type glutamate receptors are found in post-synaptic targets of adrenergic the thoracic spinal cord. *Brain Res* 856:1-11.

Auerbach L (1864) Fernere vorläufige Mitteilung über den Nervenapparat des Darmes. *Arch Patol Anat Physiol* 30:457-460.

Ayata C, Ayata G, Hara H, Matthews RT, Beal MF, Ferrante RJ, Endres M, Kim A, Christie RH, Waeber C, Huang PL, Hyman BT, Moskowitz MA (1997) Mechanisms of reduced striatal NMDA excitotoxicity in type 1 nitric oxide synthase knock-out mice. *J Neurosci* 17:6908-6917.

Bagyánszki M, Román V, Fekete É (2000) Quantitative distribution of NADPH-diaphorase-positive myenteric neurons in different segments of the developing chicken small intestine and colon. *Histochem J* 32:679-684.

Bagyánszki M, Kovács ÉG, Román V, Resch BÁ, Fekete É (2002a) Computer-aided morphometric analysis of the developing concentric structure of the human fetal intestinal tube. *Histol Histopathol* 17:731-737.

Bagyánszki M, Román V, Krecsmarik M, Resch BÁ, Fekete É (2002b) Individual distribution and colocalization of nitric oxide synthase with vasoactive intestinal polypeptide and neuropeptide Y in the developing human fetal intestine. *Acta Biol Szeged* 46:17-23.

Balaskas C, Saffrey MJ, Burnstock G (1995a) Distribution of NADPH-diaphorase activity in the embryonic chicken gut. *Anat Embryol* 192:239-245.

Balaskas C, Saffrey MJ, Burnstock G (1995b) Distribution and colocalization of NADPH-diaphorase activity, nitric oxide synthase immunoreactivity and VIP immunoreactivity in the newly hatched chicken gut. *Anat Rec* 243:10-18.

Beck F, Tata F, Chawengsakophak K (2000) Homeobox genes and gut development. *BioEssays* 22:431-441.

Belai A, Schmidt HHHW, Hoyle CHV, Hassell CJS, Saffrey HJ, Moss J, Forstermann U, Murad F, Burnstock G (1992) Co-localization of nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in the myenteric plexus of the rat gut. *Neurosci Lett* 143:60-64.

Belai A, Cooper S, Burnstock G (1995) Effect of age on NADPH-diaphorase-containing myenteric neurons of rat ileum and proximal colon. *Cell Tissue Res* 279:379-383.

Björklund H, Dahl D, Seiger A (1984) Neurofilament and glial fibrillary acidic protein-related immunoreactivity in rodent enteric nervous system. *Neuroscience* 12:277-287.

Blennerhassett MG, Louressen S (2000) Neuronal regulation of intestinal smooth muscle growth in vitro. *Gastroint Liv Phys* 279:G511-G519.

Bogers JJ, Pelckmans PA, Boeckxstaens GE, De Man JG, Herman AG, Van Maercke YM (1991) The role of nitric oxide in serotonin-induced relaxations in the canine terminal ileum and ileocolonic junction. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 344:716-719.

Boros A, Timmermans JP, Fekete É, Adriaensen D, Scheuermann DW (1994) Appearance and some neurochemical features of nitrergic neurons in the developing quail digestive tract. *Histochemistry* 101:365-374.

Braganca de Vasconcellos Fontes R, Froes LB, Omar ED, Liberti EA (2004) The myenteric plexus of the rat colon after fecal stream diversion: a morpho-quantitative study. *Auton Neurosci Basic Clin* 114:39-46.

Brandt CT, Tam PKH, Gould SJ (1996) Nitrergic innervation of the human gut during early fetal development. *J Pediatr Surg* 31(5):661-664.

Bredt DS (1995) Molecular characterization of nitric oxide synthase. In: Vincent SR (ed) *Nitric oxide in the nervous system*. Academic Press, London San Diego New York, pp. 1-19.

Bredt DS, Snyder SH (1994) Nitric oxide: a physiological messenger molecule. *Ann Rev Biochem* 63:175-182.

Brehmer A, Schrödl F, Neuhuber W (1999a) Morphological classification of enteric neurons – 100 years after Dogiel. *Anat Embryol* 200:125-135.

Brehmer A, Schrödl F, Neuhuber W, Hens J, Timmermans JP (1999b) Comparison of enteric neuronal morphology as demonstrated by DiI-tracing under different tissue-handling conditions. *Anat Embryol* 199:57-62.

Brehmer A, Schrödl F, Neuhuber W, Tooyama I, Kimura T (2004) Co-expression pattern of neuronal nitric oxide synthase and two variants of choline acetyltransferase in myenteric neurons of porcine ileum. *J Chem Neuroanat* 27:33-41.

Brehmer A, Stach W (1998) Regional differences in the neuronal composition of myenteric ganglia along the pig small intestine. *Anat Rec* 250:109-116.

Broussard DL, Li X, Pritchett DB, Lynch D, Bannermann PG, Pleasure D (1994) The expression of a NMDA receptor gene in guinea-pig myenteric plexus. *Neuroreport* 5(8):973-976.

Burns GA, Stephens KE (1995) Expression of mRNA for the N-methyl-D-aspartate (NMDAR1) receptor and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) co-exist in enteric neurons of the rat. *J Auton Nerv Syst* 55:207-210.

Burns GA, Stephens KE, Benson JA (1994) Expression of mRNA for the N-methyl-D-aspartate (NMDAR1) receptor by the enteric neurons of the rat. *Neurosci Lett* 170(1):87-90.

Clerc N, Furness JB, Bornstein JC, Kunze WAA (1998) Correlation of electrophysiological and morphological characteristics of myenteric neurons of the duodenum in the guinea-pig. *Neuroscience* 82:899-914.

Cosentino M, De Ponti F, Marino F, Giaroni C, Leoni O, Lecchini S, Frigo G (1995) N-methyl-D-aspartate receptors modulate neurotransmitter release and peristalsis in the guinea-pig isolated colon. *Neurosci Lett* 183:139-142.

Costa M, Brookes SJ, Hennig GW (2000) Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* 47(Suppl IV):iv15-iv19.

Cracco C, Filogamo G (1993) Mesenteric neurons in the adult rat are responsive to ileal treatment with benzalkonium chloride. *Int J Dev Neurosci* 11(1):49-61.

Cracco C, Filogamo G (1994) Quantitative study of the NADPH-diaphorase-positive myenteric neurons of the rat ileum. *Neuroscience* 61(2):351-359.

Dogiel AS (1896) Zwei Arten sympatischer Nervenzellen. *Anat Anz* 11:679-687.

Donat ME, Wong K, Staines WA, Krantis A (1999) Heme oxygenase immunoreactive neurons in the rat intestine and their relationship to nitric neurons. *J Auton Nerv Syst* 77(1):4-12.

Doyle AM, Roberts DJ, Goldstein AM (2004) Enteric nervous system patterning in the avian hindgut. *Dev Dyn* 229:708-712.

Durbec PL, Larsson-Blomberg LB, Schuchardt A, Constantini F, Pachnis V (1996) Common origin and developmental dependence on c-ret of subsets of enteric and sympathetic neuroblasts. *Development* 122:349-358.

Eaker EZ (1997) Neurofilament and intermediate filament immunoreactivity in human intestinal myenteric neurons. *Dig Disease Sci* 42(9):1926-1932.

Epstein ML, Poulsen KT (1991) Appearance of somatostatin and vasoactive intestinal peptide along the developing chicken gut. *J Comp Neurol* 311:168-178.

Epstein ML, Poulsen KT, Thiboldeaux R (1991) Formation of ganglia in the gut of the chick embryo. *J Comp Neurol* 307:189-199.

Erickson CA, Weston JA (1999) VENT cells: a fresh breeze in a stuffy field? *TINS* 22:486-488.

Fairman CL, Clagett-Dame M, Lennon VA, Epstein ML (1995) Appearance of neurons in the developing chicken gut. *Dev Dyn* 204:192-201.

Faussone-Pellegrini MS (1987) Comparative study of interstitial cells of Cajal. *Acta Anat* 130:109-126.

Fekete É, Benedeczky I, Timmermans JP, Resch BA, Scheuermann DW (1996) Sequential pattern of nerve-muscle contacts in the small intestine of developing human fetus. *Histol Histopathol* 11:845-850.

Fekete É, Timmermans JP, Resch BA, Scheuermann DW (1999) Different distribution of S-100 protein and glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactive cells and their relations with nitergic neurons in the human fetal small intestine. *Histol Histopathol* 14:785-790.

Fu M, Tam PKH, Sham MH, Lui VCH (2004) Embryonic development of the ganglion plexuses and the concentric layer structure of human gut: a topographical study. *Anat Embryol* 208:33-41.

Fukuda K, Yasugi S (2002) Versatile roles for sonic hedgehog in gut development. *J Gastroenterol* 37:239-246.

Furness JB (2000) Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 81:87-96.

Furness JB, Jones C, Nurgali K, Clerc N (2004) Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog Neurobiol* 72:143-164.

Furness JB, Costa M (1987) *The Enteric Nervous System*. Edinburgh, Churchill Livingstone.

Furness JB, Johnson PJ, Pompolo S, Bornstein JC (1995) Evidence that enteric motility reflexes can be initiated through entirely intrinsic mechanisms in the guinea-pig small intestine. *Neurogastroenterol Motil* 7:89-96.

Gabella G (1987) The number of neurons in the small intestine of mice, guinea-pigs and sheep. *Neuroscience* 22(2):737-752.

Galligan JJ (2002) Ligand-gated ion channels in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 14(6):611-623.

Gershon MD (1995) Neural crest development. Do developing enteric neurons need endothelins? *Curr Biol* 5:601-604.

Gershon MD (1997) Genes and lineages in the formation of the enteric nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 7:101-109.

Gershon MD (1998) *The Second Brain*. New York, Harper Collins.

Gershon MD (2003) Plasticity in serotonin control mechanisms in the gut. *Curr Opin Pharmacol* 3:600-607.

Gershon MD, Kirchgessner AL, Wade PR (1994) In *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (Vol. 1) Edited by Jonson LR. New York, Raven Press, pp 381-422.

Geuna S, Borriore P, Filogamo G (2002) Postnatal histogenesis in the peripheral nervous system. *Int J Devl Neurosci* 20:475-479.

Giaroni C, Zanetti E, Chiravalli AM, Albarello L, Dominioni L, Capella C, Lecchini S, Frigo G (2003) Evidence for glutamatergic modulation of the cholinergic function in the human enteric nervous system via NMDA receptors. *Eur J Pharmacol* 476:63-69.

Grider JR, Kuemmerle JF, Jin JG (1996) 5-HT released by mucosal stimuli initiates peristalsis by activating 5-HT<sub>4</sub>/5-HT<sub>1p</sub> receptors on sensory CGRP neurons. *Am J Physiol* 270:G778-782.

Gross CG (2000) Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Rev Neurosci* 1:67-73.

Herrmann H, Aebi U (2000) Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr Opin Cell Biol* 12:79-90.

Holle GE, Dietl J, Demir I (2003) Influence of the intramural innervation on the morphogenesis of the enteroendocrine cells and the genetic construct involved. *Int J Mol Med* 11(3):275-285.

Holst MC, Powley TL (1995) Cuproinic blue (quinolinic phthalocyanin) counterstaining of enteric neurons for peroxidase immunocytochemistry. *J Neurosci Methods* 62:121-127.

Hornby PJ (2001) Receptors and transmission in the brain-gut axis II. Excitatory amino acid receptors in the brain gut axis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:G1055-G1060.

Horowitz B, Ward SM, Sanders KM (1999) Cellular and molecular basis for electrical rhythmicity in gastrointestinal muscles. *Annu Rev Physiol* 61:19-43.

Hosoda K, Hammer RE, Richardson JA, Baynash AG, Cheung JC, Giaid A, Yanagisawa M (1994) Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* 79:1277-1285.

Jankovic SM, Milovanovic D, Matovic M, Iric-Cupic V (1999) The effects of excitatory amino acids on isolated gut segments of the rat. *Pharm Res* 39(2):143-148.

Jarvinen MK, Wollmann WJ, Powrozek TA, Schultz JA, Powley TL (1999) Nitric oxide synthase-containing neurons in the myenteric plexus of the rat gastrointestinal tract: distribution and regional density. *Anat Embryol* 199:99-112.

Jiang Y, Liu MT, Gershon MD (2003) Netrins and DCC in the guidance of migrating neural crest-derived cells in the developing bowel and pancreas. *Dev Biol* 258(2):364-384.

Kapur RP (2000) Colonization of the murine hindgut by sacral crest-derived neural precursors: experimental support for an evolutionary conserved model. *Dev Biol* 227:146-155.

Karaosmanoglu T, Aygun B, Wade PR, Gershon MD (1996) Regional differences in the number of neurons in the myenteric plexus of the guinea pig small intestine and colon: an evaluation of markers used to count neurons. *Anat Rec* 244:470-480.

Keranen U, Vanhatalo S, Kiviluoto T, Kivilaakso E, Soinila S (1995) Co-localization of NADPH diaphorase reactivity and vasoactive intestinal polypeptide in human colon. *J Auton Nerv Syst* 54(3):177-183.

Kirchgessner AL (2001) Glutamate in the enteric nervous system. *Curr Opin Pharmacol* 1:591-596.

Kirchgessner AL, Gershon MD (1990) Innervation of the pancreas by neurons in the gut. *J Neurosci* 10:1626-1642.

Kirkup AJ, Brunsten AM, Grundy D (2001) Receptors and transmission in the brain-gut axis: Potential for novel therapies I. Receptors on visceral afferents. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:G787-G794.

Langley JN (1900) The sympathetic and other related systems of the nerves. In: Schaffer EA (ed) *Textbook of Physiology*. Pentland, Edinburgh pp 616-619.

Le Douarin NM (2004) The avian embryo as a model to study the development of the neural crest: a long and still ongoing story. *Mech Dev* 121:1089-1102.

Le Douarin NM (1982) *The Neural Crest*. Cambridge, Cambridge University Press.

Le Douarin NM, Teillet MA (1973) The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J Embryol Exp Morphol* 30:31-48.

Le Douarin NM, Renaud D, Teillet MA, LeDouarin GH (1975) Cholinergic differentiation of presumptive adrenergic neuroblasts in interspecific chimaeras after heterotopic transplantations. *Proc Natl Acad Sci* 72:728-732.

Lefebvre RA (1995) Nitric oxide in the peripheral nervous system. *Ann Med* 27:379-388.

Li ZS, Furness JB (2000) Inputs from intrinsic primary afferent neurons to nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in the myenteric plexus of guinea-pig ileum. *Cell Tissue Res* 299:1-8.



Liu MT, Rothstein JD, Gershon MD, Kirchgessner AL (1997) Glutamatergic enteric neurons. *J Neurosci* 17(12):4764-4784.

Llewellyn-Smith IJ, Song ZM, Costa M, Bredt DS, Snyder SH (1992) Ultrastructural localization of nitric oxide synthase immunoreactivity in guinea-pig enteric neurons. *Brain Res* 577:337-342.

Lynch DR, Guttman RP (2001) Excitotoxicity: perspectives based on N-methyl-D-aspartate receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 300:717-723.

Mashimo H, Ho XD, Huang PL, Fishman MC, Goyal RK (1996) Neuronal constitutive nitric oxide synthase is involved in murine enteric inhibitory neurotransmission. *J Clin Invest* 98(1):8-13.

Matini P, Fausone-Pellegrini MS (1997) Ultrastructural localization of neuronal nitric oxide synthase-immunoreactivity in the rat ileum. *Neurosci Lett* 229:45-48.

Meissner G (1857) Über die Nerven des Darmwand. *Z Ration Med N F* 8:364-366.

Mendelson D, Tas J, James J (1983) Cuproinic blue: a specific dye for single-stranded RNA in the presence of magnesium chloride. II. Practical applications light microscopy. *Histochem J* 15:1113-1121.

Milovanovic DR, Jankovic SM (2002) A pharmacological analysis of the contractile effects of glutamate on rat and human isolated gut smooth muscle strips. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 24(10):661-668.

Mirabella N, Lamanna C, Assisi L, Botte V, Cecio A (2000) The relationships of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-d to nitric oxide synthase, vasoactive intestinal polypeptide, galanin and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in pigeon gut neurons. *Neurosci Lett* 293(2):147-151.

Moore KL (1989) The ninth to thirty-eight week human development. In: *Before we are born. Basic Embryology and birth defects*. 3rd ed. W.B. Saunders Company Philadelphia. pp 73-85.

Newgreen D, Young HM (2002a) Enteric nervous system: development and developmental disturbances – Part 1. *Pediatr Dev Pathol* 5:224-247.

Newgreen D, Young HM (2002b) Enteric nervous system: development and developmental disturbances – Part 2. *Pediatr Dev Pathol* 5:329-349.

Ogura T, Nakayama K, Fujisawa H, Esumi H (1996) Neuronal nitric oxide synthase expression in neuronal cell differentiation. *Neurosci Lett* 204:89-92.

Parisi Salvi E, Vaccaro R, Baglaj SM, Renda T (2004) Nervous system development in normal and atresic chick embryo intestine: an immunohistochemical study. *Anat Embryol* 209:143-151.

Parr EJ, Sharkey KA (1994) The use of constitutive nuclear oncoproteins to count neurons in the enteric nervous system of the guinea pig. *Cell Tissue Res* 277:325-331.

Phillips RJ, Hargrave SL, Rhodes BS, Zopf DA, Powley T (2004) Quantification of neurons in the myenteric plexus: an evaluation of putative pan-neuronal markers. *J Neurosci Met* 133:99-107.

Pimont S, Bruley Des Varannes S, Le Neel JC, Aubert P, Galmiche JP, Neunlist M (2003) Neurochemical coding of myenteric neurones in the human gastric fundus. *Neurogastroenterol Motil* 15:655-662.

Pomeranz HD, Gershon MD (1990) Colonization of the avian hindgut by cells derived from the sacral neural crest. *Dev Biol* 137:378-394.

Pomeranz HD, Sherman DL, Smalheiser NR, Tennyson VM, Gershon MD (1991) Expression of a neurally related laminin binding protein by neural crest-derived cells that colonize the gut: relationship to the formation of enteric ganglia. *J Comp Neurol* 313:625-642.

Ramalho-Santos M, Melton DA, McMahon AP (2000) Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development* 127:2763-2772.

Roberts DJ (2000) Molecular mechanisms of development of the gastrointestinal tract. *Dev Dyn* 219:109-120.

Roche KW, Standley S, McCallum J, Dune LyC, Ehlers MD, Wenthold RJ (2001) Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nat Neurosci* 4:794-802.

Román V, Krecsmarik M, Bagyánszki M, Fekete É (2001) Evaluation of the total number of myenteric neurons in the developing chicken gut using cuproline blue histochemical staining and neurofilament immunocytochemistry. *Histochem Cell Biol* 116:241-246.

Román V, Bagyánszki M, Krecsmarik M, Horváth A, Resch BÁ, Fekete É (2004) Spatial pattern analysis of nitrergic neurons in the developing myenteric plexus of the human fetal intestine. *Cytometry Part A* 57A:108-112.

Román V, Bagyánszki M, Krecsmarik M, Resch BÁ, Fekete É (közlésre beadva) Glutamate and NMDA receptor immunoreactivity in myenteric neurons of the human fetal small intestine. *Histochem Cell Biol*

Rothman TP, Chen J, Howard MJ, Constantini FD, Pachnis V, Gershon MD (1996) Increased expression of laminin-1 and collagen (IV) subunits in the aganglionic bowel of *ls/ls*, but not *c-ret<sup>-/-</sup>* mice. *Dev Biol* 178:498-513.

Salmhofer H, Neuhuber WL, Ruth P, Huber A, Russwurm M, Allescher HD (2001) Pivotal role of the interstitial cells of Cajal in the nitric oxide signaling pathway of rat small intestine. *Cell Tissue Res* 305:331-340.

Sanchez MP, Silos-Santiago I, Frisen J, He B, Lira SA, Barbacid M (1996) Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature* 382:70-73.

Sanders KM, Ördög T, Koh SD, Ward SM (2000) A novel pacemaker mechanism derives gastrointestinal rhythmicity. *News Physiol Sci* 15:291-298.

Sandgren K, Lin Z, Svenningsen AF, Ekblad E (2003) Vasoactive intestinal peptide and nitric oxide promote survival of adult rat myenteric neurons in culture. *J Neurosci Res* 72(5):595-602.

Sang Q, Williamson S, Young HM (1997) Projections of chemically identified myenteric neurons of the small and large intestine of the mouse. *J Anat* 190:209-222.

Santos GC, Zucoloto S, Garcia SB (2000) Endocrine cells in the denervated intestine. *Int J Exp Pathol* 81(4):265-270.

Sayegh AI, Ritter RC (2003) Morphology and distribution of nitric oxide synthase-, neurokinin-1 receptor-, calretinin-, calbindin-, and neurofilament-M-immunoreactive neurons in the myenteric and submucosal plexuses of the rat small intestine. *Anat Rec* 271A:209-216.

Schäfer KH, Hänsgen A, Mestres P (1999) Morphological changes of the myenteric plexus during early postnatal development of the rat. *Anat Rec* 256:20-28.

Scherer-Singler U, Vincent SR, Kimura H, McGeer EG (1983) Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. *J Neurosci Methods* 9:229-234.

Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Constantini F, Pachnis V (1994) Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature* 367:380-383.

Sharkey KA, Parr EJ (1996) The enteric nervous system in intestinal inflammation. *Can J Gastroenterol* 10:335-341.

Silva AT, Dolatshad NF, Wardhaugh T, Saffrey MG (2000) Evidence for undifferentiated progenitor cells in the postnatal myenteric plexus: nestin expression. *Eur J Neurosci* 12(S11):263.

Sinsky M, Donnerer J (1998) Evidence for a neurotransmitter role of glutamate in guinea pig myenteric plexus neurons. *Neurosci Lett* 258:109-112.

Sohal GS, Ali MM, Farooqui FA (2002) A second source of precursor cells for the developing enteric nervous system and interstitial cells of Cajal. *Int J Devl Neurosci* 20:619-626.

Sukegawa A, Narita T, Kameda T (2000) The concentric structure of the developing gut is regulated by Sonic hedgehog derived from endodermal epithelium. *Development* 127:1971-1980.

Szentágothai J, Réthelyi M (1996) *Funkcionális anatómia*. Budapest, Medicina és Semmelweis Kiadók.

Taraviras S, Pachnis V (1999) Development of the mammalian enteric nervous system. *Curr Opin Gen Dev* 9:321-327.

Teitelman G, Gershon MD, Rothman TP, Jop TH, Reis DJ (1981) Proliferation and distribution of cells that transiently express a catecholaminergic phenotype during development of mice and rats. *Dev Biol* 86:348-355.

Timmermans JP, Barbiers M, Scheuermann DW, Bogers JJ, Adriaensen D, Fekete E, Mayer B, Van Marck EA, De Grootd-Lasseel MHA (1994) Nitric oxide synthase immunoreactivity in the enteric nervous system of the developing human digestive tract. *Cell Tissue Res* 275:235-245.

Timmermans JP, Adriaensen D, Lefebvre R (1999) Postnatal development of nitrergic neurons in the myenteric plexus of rat stomach. *Histochem Cell Biol* 111:429-434.

Tong Q, Kirchgessner AL (2003) Localization and function of metabotropic glutamate receptor 8 in the enteric nervous system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285:G992-G1003.

Tong Q, Ma J, Kirchgessner AL (2001) Vesicular glutamate transporter 2 in the brain-gut axis. *Neuroreport* 12(18):3929-3934.

Van Geldre LA, Fraeyman NH, Peeters TL, Timmermans JP, Lefebvre RA (2004) Further characterization of particulate neuronal nitric oxide synthase in rat small intestine. *Auton Neurosci* 110(1):8-18.

Van Ginneken C, Van Meir F, Sommereyns G, Sys S, Weyns AA (1998) Nitric oxide synthase expression in enteric neurons during development in the pig duodenum. *Anat Embryol* 198:399-408.

Van Ginneken C, De Smet MJ, Van Meir F, Weyns AA (1999) Microwave staining of enteric neurons using cuproline blue (quinolinic phthalocyanin) combined with enzyme histochemistry and peroxidase immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 47:13-21.

Vanner S, Surpernant A (1996) Neural reflexes controlling intestinal microcirculation. *Am J Physiol* 271:G223-G230.

Ward SM, Xue C, Shuttleworth CW, Bredt DS, Snyder SH, Sanders KM (1992) NADPH diaphorase and nitric oxide synthase colocalization in enteric neurons of canine proximal colon. *Am J Physiol* 263:G277-G284.

Ward SM, Beckett EAH, Wang XY, Baker F, Khoyi M, Sanders KM (2000) Interstitial cells of Cajal mediate cholinergic neurotransmission from enteric motor neurons. *J Neurosci* 20:1393-1403.

Wester T, O'Briain S, Puri P (1998) Morphometric aspects of the submucous plexus in whole-mount preparations of normal human distal colon. *J Pediatr Surg* 33:619-622.

Wu M, Van Nassauw L, Kroese ABA, Adriaensen D, Timmermans JP (2003) Myenteric nitrenergic neurons along the rat esophagus: evidence for regional and strain differences in age-related changes. *Histochem Cell Biol* 119:395-403.

Young HM, Ciampoli D, Hsuan J, Canty AJ (1999) Expression of ret-, p75(NTR)-, Phox2a-, Phox2b-, and tyrosine hydroxylase-immunoreactivity by undifferentiated neural crest-derived cells and different classes of enteric neurons in the embryonic mouse gut. *Dev Dyn* 216:137-152.

Young HM, Furness JB, Sewell P, Burcher EF, Kandiah CJ (1993) Total numbers of neurons in myenteric ganglia of the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res* 272:197-200.

Yunker AM, Galligan JJ (1994) Extrinsic denervation increases NADPH-diaphorase staining in myenteric nerves of guinea pig ileum. *Neurosci Lett* 167:51-54.

Zakhary R, Poss KD, Jaffrey SR, Ferris CD, Tonegawa S, Snyder SH (1997) Targeted gene deletion of heme oxygenase 2 reveals neural role for carbon monoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:14848-14853.

Zar JH (1984) *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.

Zhang X, Fogel R (2003) Involvement of glutamate in gastrointestinal vago-vagal reflexes initiated by gastrointestinal distension in the rat. *Auton Neurosci* 103(1-3):19-37.

## **8. Köszönetnyilvánítás**

Legelsőként Dr. Fekete Éva habilitált egyetemi docensnek köszönöm meg, hogy mind szakdolgozóként, mind doktorandusz hallgatóként oly sokat és odaadóan foglalkozott velem. Szakmai segítségnyújtása, türelme és embersége nélkül ez a disszertáció nem készülhetett volna el.

Köszönöm Dr. Gulya Károly tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette az SZTE Állattani és Sejtbiológiai Tanszékén doktori téziseim elkészítését.

Köszönettel tartozom továbbá azért a segítségért, amit Dr. Resch Béla Árpád egyetemi tanártól és közvetlen munkatársaimtól, Dr. Bagyánszki Mária egyetemi adjunktustól és Krecsmarik Mónika doktorandusz hallgatótól kaptam.

Köszönöm az Állattani és Sejtbiológiai Tanszéken dolgozó munkatársaknak, Ambrus Józsefnének, Bakota Lidiának, Körtvély Elődnek, Szigeti Csabának és Várszegi Szilviának, hogy ha kellett, segítettek, bármilyen problémával is fordultam hozzájuk.

Nagy köszönettel tartozom Családomnak azért a sok szeretetért és támogatásért, amit tőlük kaptam tanulmányaim során.

## MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK

M. Bagyánszki, **V. Román**, É. Fekete (2000) Quantitative distribution of NADPH-diaphorase-positive myenteric neurons in different segments of the developing chicken small intestine and colon. *Histochem. J.* 32(11):679-684. **IF: 1.169**

**V. Román**, M. Krecsmarik, M. Bagyánszki, É. Fekete (2001) Evaluation of the total number of myenteric neurons in the developing chicken gut using cuproinic blue histochemical staining and neurofilament immunocytochemistry. *Histochem. Cell Biol.* 116(3):241-246. **IF: 2.477**

M. Bagyánszki, É.G. Kovács, B.Á. Resch, **V. Román**, B.E. Resch, É. Fekete (2002) Computer-aided morphometric analysis of the developing concentric structure of the human fetal intestinal tube. *Histol. Histopathol.* 17(3):731-737. **IF: 1.859**

M. Bagyánszki, **V. Román**, M. Krecsmarik, B.Á. Resch, É. Fekete (2002) Individual distribution and colocalization of nitric oxide synthase with vasoactive intestinal polypeptide and neuropeptide Y in the developing human fetal small intestine. *Acta Biologica Szegediensis* 46(1-2):17-23.

**V. Román**, M. Bagyánszki, M. Krecsmarik, A. Horváth, B.Á. Resch, É. Fekete (2004) Spatial pattern analysis of nitrergic neurons in the developing myenteric plexus of the human fetal intestine. *Cytometry* 57A:108-112. **IF: 2.220**