

Fedőlap

Nyugat Magyarországi Egyetem Savaria Egyetemi Központ Szombathely
Természettudományi és Műszaki Kar
Állattani Tanszék

A rovarok szaglása

Konzulens:
Dr. Molnár Péter
Adjunktus

Készítette:
Kulics Aliz
Biológia Bsc

Szombathely
2010

Tartalomjegyzék

1	Összefoglalás	1
2	Célkitűzés	2
3	Bevezetés	3
3.1	A szaglás jelentősége az állatvilágban	3
3.2	A rovarok szaglórendszere	4
3.2.1	A rovarok idegrendszerének általános leírása.....	4
3.2.2	A rovarok szaglószervei	6
3.2.3	Az antennális lebeny	11
3.2.4	A gombatest, mint asszociációs központ:	14
3.3	Gerinces és rovar szaglórendszer összehasonlítása.....	20
3.3.1	Szagló receptor neuronok gerincesekben.....	21
3.3.2	Vomeronasalis szerv	23
3.3.3	Szaglóhagyma	24
3.3.4	A szagló kéreg.....	25
4	Módszerek	26
4.1	Az agydúc feltárása	26
4.2	Metszetkészítés	26
4.3	Szövetteni festések	27
4.3.1	Haematoxilin-eosin festés	27
4.3.2	Cresyl -ibolya festés	28
4.4	Elektrofiziológia.....	29
5	Eredmények	29
5.1	Hisztológia	29
5.2	Fiziológia	33
6	Megvitatás	34
7	Irodalomjegyzék	36

Rövidítések jegyzéke

AL	Antennális lebeny
Ca/CaMK	Ca ²⁺ /kalmodulin kináz
cAMP	Ciklikus adenzin monofoszfát
DA	Dopamin
EAG	Electroantennograf
GABA	γ-aminovajsav
GPCR	G-protein kapcsolt receptorok
IR	Ionotróp receptor
LN	Helyi neuron
MGC	Makroglomeruláris komplex
NO	Nitrogén monoxid
NOS	Nitrogén monoxid szintáz
OA	Oktopamin
OBP	Kötő fehérjék
ODP	Degradáló enzimek
OR	Szagló receptor
ORN	Szagló receptor neuron
PKA	Protein kináz A
PKG	Protein kináz G
PN	Projekciós neuron

1 Összefoglalás

A rovarok szaglása széles körben kutatott terület, elsősorban mezőgazdasági jelentősége miatt. A kutatások fő célja specifikus csalogató, ölü szerek valamint hatékonyabb csapdázási módszerek kifejlesztése. A rovar szaglás vizsgálatának másik irányvonalára, a tanulás és memória kialakulásának tanulmányozása. Mivel a rovarok szagló rendszere hasonló felépítésű, mint a gerincesek, és így az ember szagló rendszere, ezért a rovarok hatékony modellek lehetnek az ilyen irányú kutatásokban. A szakdolgozat célja a rovarok szaglásához kapcsolódó folyamatok áttekintése, összefoglalása a témában megjelent szakirodalom alapján, megteremtve az alapot egy saját kutatás elindításához. Létrehoztunk a rovarok szaglásának vizsgálatára egy kísérletes mérőrendszert, mellyel képesek vagyunk szagmolekulák által kiváltott válaszokat detektálni. Valamint sáska (*Schistocerca* sp.) agydúcából készített metszeteken több festési eljárást is beállítottunk, ami alapján a szakirodalom által említett struktúrákat azonosítottuk. Munkánk elősegítheti a következő hallgató generáció számára, az állatélettani gyakorlaton való kísérletezést, valamint további, a témához kapcsolódó szakdolgozatok elkészítését.

2 Célkitűzés

1. A rovarok szaglórendszerének anatómiai, molekuláris biológiai és fiziológiai leírása a témában megjelent szakirodalom alapján.
2. Sáskák szaglórendszerének anatómiai vizsgálata, szövettani módszerek kidolgozása és laboratóriumi feltételeinek létrehozása.
3. Sáskák szaglórendszerének fiziológiai vizsgálata extracelluláris elektrofiziológiai módszerekkel. Elektrofiziológiai mérőrendszer felépítése és a mérések laboratóriumi feltételeinek létrehozása.

3 Bevezetés

3.1 A szaglás jelentősége az állatvilágban

A levegőben oldott kémiai anyagok fontos információt hordoznak a külvilágról, melyek érzékelésére a túlélés záloga lehet az állatvilágban. A szaglás során szerzett információk figyelmeztethetnek a veszélyre, segíthetnek megtalálni a táplálékforrásokat és a párválasztásban, utódgondozásban is fontos szerepet tölthetnek be. Az állatok képesek egymással kommunikálni különböző kémiai anyagok kibocsátásával. Ezeket, az anyagokat feromonnak nevezzük (Széky 1986). A feromonok többnyire vízben oldódó hormontermészetű anyagok, melyek illó anyagokként terjednek szét. Elsősorban az adott faj egyedei közötti információáramlást szolgálja, de más fajok egyedeinek is tartalmazhat hasznos információt. Az állatok által kiválasztott kémiai anyagok sokféle funkcióval bírhatnak. Figyelmeztethetnek a veszélyre, méheknél a királynő képes olyan anyagokat termelni, mely a dolgozók agresszivitását váltja ki. Megjelölhetik a fajtársaik számára a táplálékhoz vezető utat, a hangyák nyomjelző feromonja fajspecifikus és a bélcsatornából vagy az úgynevezett Dofour-mirigyből származik. Más feromonok kijelölhetik az állatok territóriumának határait. Kutyafélénél (Canidae), macskafélénél (Felidae) a vizelettel való jelölés a leggyakoribb. Az őzbak homlokán lévő suborbitális mirigyének váladékát dörzsöli a bokrok ágaira. Az állatok a kibocsátott ivari feromonjaikkal vonzzák az ellentétes nem képviselőit. Rovaroknál is jellemző az ellenkező nem feromonokkal való vonzása, mint például a lisztbogárnál (*Tenebrio molitor*) vagy a keleti gyümölcsmolynál (*Grapholita molesta*). A szaglás és különösen a feromonok az utódgondozásban és a születésszabályzásban is jelentős szerepet játszhatnak. Vemhes nőstény patkány, ha a vemhesség korai szakaszában hím feromonját érzékeli, akkor elvetél, és újra ivarzik. Fajtárs megismerése egereknél a vizelet és a talppárna mirigyei által termelt szagok alapján történik. Mindezek alapján megállapíthatjuk, hogy a szaglás elengedhetetlen érzékelési mód az állatvilágban, biztosíthatja az egyed túlélését, meghatározhatja az egyed csoportban betöltött szerepét, kijelölheti a territóriumot, részt vehet a szaporodásban és az utódgondozásban (Széky 1986).

3.2 A rovarok szaglórésze

3.2.1 A rovarok idegrendszerének általános leírása

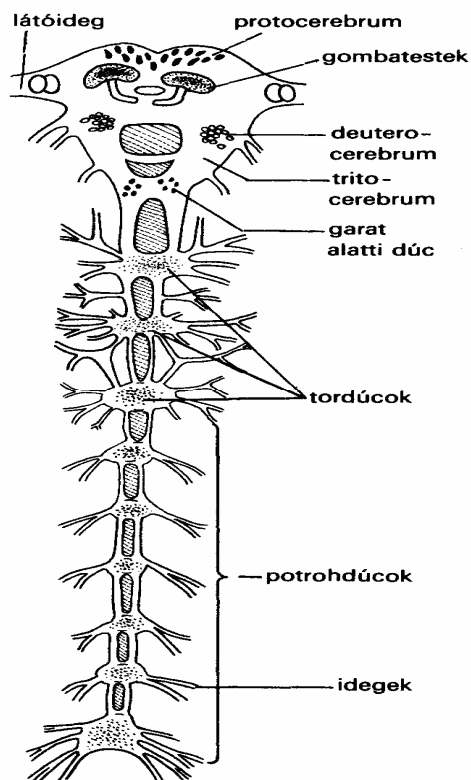
A rovarok idegrendszere hasdúclánc idegrendszer, ami centrális, viszcerális és parietális részre osztható. A központi idegrendszert az első három feji szelvény összeolvadt dúcaiból létre jövő agydúcból (cerebrum) és a hasdúcláncból áll (Zboray 1998, Vigh és Kondics 1997).

Az agydúc három részre különíthető el, az előagyra (protocerebrum), a középagyra (deutocerebrum) és az utóagyra (tritocerebrum) (1. ábra). A rovarok idegrendszere neuronokból és neurogliából áll. A neuronok lehetnek unipolárisak, bipolárisak és multipolárisak. Funkció szerint érző és motoros neuronok valamint információt feldolgozó interneuronokat különböztetünk meg. A neuronok ganglionokban helyezkednek el, axonjaik pályákat hoznak létre. A gangliont epineurium veszi körül, a neuronok ez alatt a réteg alatt helyezkednek el, a ganglion centrális részét a neuronok dendritjei, axonjai, valamint támasztó szerepet betöltő gliaszövet képezi (Zboray 1998, Vigh és Kondics 1997). Az előagyi dúcpár a fejtök felső harmadát foglalja el. Két oldalán található a látó lebenyek (lobus opticus), melyek az összetett szemeket idegzik be.

A protocerebrális agyterületen helyezkednek el a gombatestek, más néven nyelestestek (corpus pedunculata), a legfontosabb asszociációs és érző központok, ahol az öröklött és tanult magatartásformák is kialakulnak. A gombatesteket unipoláris neuronok és a rostaállomány építi fel. Előbb vagy utóbb az összes érző impulzus eljut a gombatest neuronjaihoz, a belőlük kiinduló motoros rostok szabályozzák a hasdúclánc működését. A nyeles testből kiinduló leszálló pályák a centrális testben kereszteződnek, az idegrostokból felépülő neuropiléma dorsalisán páratlan, ventrálisán páros állomány. Az agy neuroszekréciós sejtjei az úgynevezett protocerebrális hídban (pars intercerebralis) helyezkednek el, a híd köti össze a protocerebrális lebenyeket, valamint az egyszerű szemek érzőidegei is ide futnak be a gombatest elé.

A középagy idegzi be a csápokat és a szájszerveket. Legnagyobb részét az antennális lebeny (lobus olfactorius) tölti ki. Funkcionális alapegységei a

glomerulusok, ahol a szagló receptor neuronok axonjai szinapszist képeznek az antennális lebeny interneuronjaival. A glomerulusból kiinduló pályák az ellenoldali közepagi területre, valamint a gombatestekbe vezetnek. Az utóagyból kiinduló idegpár a labrumot és, a garat dorsális falához tapadt frontális gangliont idegzi be. Valamint, ventrális irányban, az utóagyi területéről ered a garatideggyűrű is. A tritocerebrum neuronjai a labrum érző idegsejtjei. Állományának többi része a fel és leszálló idegrostokból áll (Zboray 1998, Vigh és Kondics 1997).



1. ábra. Rovar idegrendszer. A rovarok dúcidegrendszerrel rendelkeznek. Az agydúc három dúcpár összeolvadásából jött létre. A környéki idegrendszer három pár torádúcból és hat pár potrohdúcból áll (Vigh és Kondics 1997).

A garat alatti dúcpár (agl.suboesophageale) a hasdúclánc kezdete, ami a szájszerveket, valamint a nyálmirigyeket idegzi be, érző és motoros neuronokat egyaránt tartalmaz, a gombatestekkel is van kapcsolata. A garatalatti dúcok szabályozzák a hasdúclánc működését, reflextevékenységeket szabályozó központként is működnek. A hasdúclánc ganglionjait longitudinális és transzverzális idegtörzsek kapcsolják össze. A garatalatti dúcok után következnek a thoracalis és abdominalis dúcok, melyek az adott szelvények izmai idegzik be.

A hasdúclánc dúcainak működését a gombatestek szabályozzák (Zboray 1998), (Vigh és Kondics 1997).

3.2.2 A rovarok szaglószervei

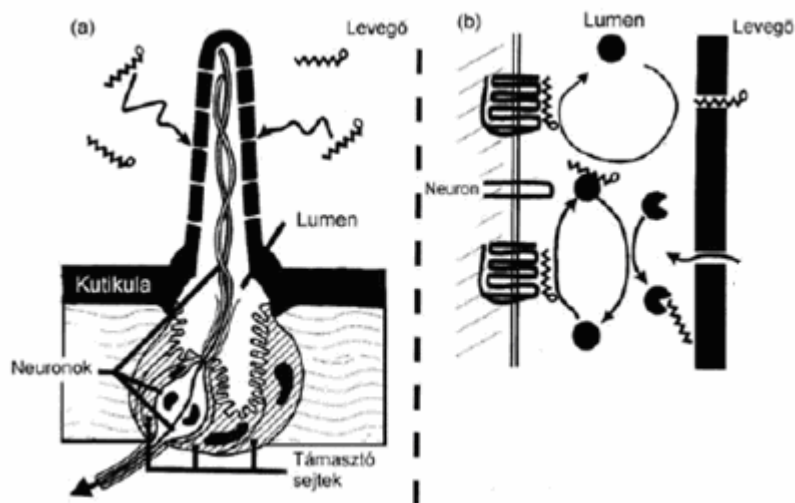
A rovarok szaglószervei kémiai ingert felfogó érzékszőrök melyek az antennán, a maxilláris tapogatókon, illetve egyes esetekben például a tojócsövön helyezkedhetnek el. A kémiai ingert felfogó érzékszőrök (szenzillák) lehetnek hártya lemezek (*sensilla placoides*), szaglókúpok (*sensilla basiconica*), szaglószőrök (*sensilla tricoidea*), gödörszőrök (*sensilla coeloconica*). A szenzillák belsejében 1, 2, 3 bipoláris primer neuron található (2. ábra). Az érzékszőrökben elhelyezkedő érzékelő neuronok csak egy bizonyos epitópra specifikus receptort fejeznek ki. Az epitóp az adott szagmolekula azon része, amit a specifikus receptor érzéklni képes (ami általában a molekula egy funkció csoportja) (Fonyó és Ligeti 2008). Ebből következően egy adott szagmolekulához több epitóp tartozik, melyeket különféle receptorok érzékelnek. Szaglószőr, gödörszőr típusú érzékszőr az antennán, szaglókúp csak a tapogatón található (Kárpáti 2007) Minden szenzilla tartalmaz valamilyen érzékelő neuront, melyek különböző receptort fejeznek ki, különböző epitópokra reagálnak és axonjaikat az antennális lebeny más-más részeibe küldik (Hansson 2002). A szaglókúpok érzékelő neuronjai inkább a táplálék illatanyagaira reagálnak, míg a szaglószőrökben elhelyezkedők a feromonokra érzékenyebbek. A szenzilla pórusain keresztül bejutó szagmolekula bejut a belső folyadékkal telt térbe, ahol azt a szagló receptor neuron csillószerűen megnyúlt dendritjeinek membránjában elhelyezkedő receptor fehérjék érzéklni képesek (Spehr és Munger 2009, Kárpáti 2007).



2. ábra. Szenzilla típusok **a:** szaglószőr (sensilla trichodea), **b:** szaglókúp (sensilla basiconica), **c:** gödörszőr (sensilla coeloconica), **d:** hártyalemez (sensilla placoides) (Kárpáti 2007)

3.2.2.1 A szagmolekula eljutása a receptorig - Kötő fehérjék (OBP) és degradáló enzimek (ODP)

A rovarok antennájának szenzállájának belsejében folyadék tér van, ahol a szagló receptor neuronok dendritjei helyezkednek el. A neuronok sejtteste és a támasztó sejtek a szenzálla alapját bélelik. A lumenális tér folyadéka kötő fehérjéket és degradáló enzimeket tartalmaz, melyeket a támasztó sejtek termelnek. A szaglószőr pórusain keresztül belépő szagmolekulákat megkötik a kötő fehérjék és a receptor sejtek dendritjeinek membránjában elhelyezkedő receptor fehérjékhez szállítják őket (3. ábra). Mivel a szagmolekulák nem maradhatnak a lumenben és nem ingerelhetik folyamatosan a receptor neuronokat, ezért a degradáló enzimek lebontják és ezzel inaktíválják őket (Rogers és mtsai. 1999). Megkülönböztetünk feromon kötő és általános szag molekulákat kötő fehérjéket, melyek közti különbségeket intenzíven kutatják (Leal és mtsai. 2009, Ribeiro Leite és mtsai. 2009; Anholt és Williams 2010).



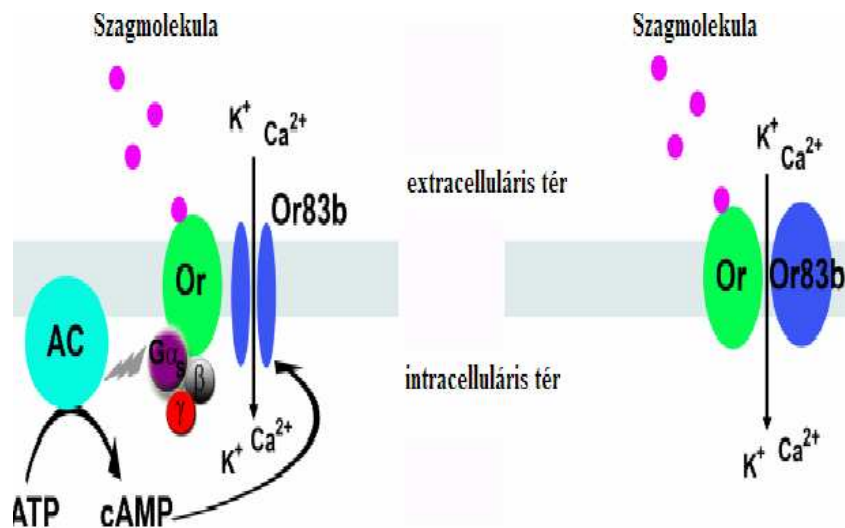
3. ábra A szagmolekula útja a detektálásig

a, A szenzilla pórusain keresztül bejutó szagmolekula bejut a belső folyadékkal telt térbe, ahol a szagló receptor neuron csilló szerűen megnyúlt dendritjeinek membránjában elhelyezkedő receptor fehérjék érzékelni képesek. **b,** A szenzilla lumenébe bejutott szagmolekulák kötőfehérjék segítségével képesek eljutni a receptoraikhoz. A folyamatos ingerlést elkerülendő a szagmolekulákat degradáló enzimek bontják le (Kárpáti 2007).

3.2.2.2 Szagló receptorok

A szaglás nem más, mint a levegőben oldott kémiai anyagok detektálása. Az antenna szenzilláiban elhelyezkedő szagló receptor neuronok a szaglás primer érzékelő neuronjai. Minden egyes szagmolekulához több epitóp tartozik, amit a szagló receptorok felismerhetnek. A szagló receptor neuronok egyféle epitópra specifikus receptor fehérjét termelnek és az ugyanazt a receptort termelő neuronok a szagló lebeny ugyanazon glomerulusát idegzik be (Vosshall 2001). *Drosophylla* esetében, antennánként, 1300 szagló receptor neuron axonja fut az antennális lebeny glomerulusaiba. (Masse és mtsai. 2009). Rovarokban a funkcionáló receptorok két receptor fehérje komplexéből állnak. A fehérje komplex egyik tagja, a rovar fajok között konzervált szerkezetű OR83b, mely csak egy másik, a szaganyagra ténylegesen specifikus receptor fehérjével (OR) heterodimerizálva képes részt venni a szaglás folyamatában. A rovarok szagló receptorai kation csatornaként működnek az érzékelő neuronok dendritjeiben. Az OR/OR83b komplex a ligand (epitóp) bekötődése után konformáció változáson megy keresztül, ennek következtében az ion csatorna kinyílik (megnövekszik a nyitási valószínűsége) és K^+ és Ca^{2+} ionok áramolnak be a sejtbe, ami

membránpotenciál változáshoz vezet (4. ábra.) (Ha és Smith 2009). Az még egy felderítendő kérdés, hogy az OR83b már önmagában is egy kation csatorna, vagy a specifikus szagló receptorral képzett komplex formál ion csatornát (Ha és Smith 2009, Benton 2006, Spehr és Munger 2009).



4. ábra. A rovarok heterodimer receptora két lehetséges modell alapján

Két modell létezik a rovarok OR/OR83 komplex működéséről. Az egyik lehetőség az, hogy Or83b már önmagában ioncsatornáként működik és csak a specifikus OR-el képes részt venni a szaglás folyamatában és működését G-fehérjék szabályozzák visszacsatolás szerűen. A másik modell szerint az OR83b az epitópokra specifikus OR-el együtt képzí a kation csatornát, aminek a nyitása előidézi az adott szagmolekula indukálta potenciálváltozást (Ha és Smith 2009).

Az állatvilágban nem csak a szaglásnál, hanem az érzékelés többi formájánál is a metabotróp (G-protein kapcsolt receptorok) receptorok játszzák a legfőbb szerepet. A rovarokban nincs közvetlen bizonyíték arra, hogy a szagló receptor neuronokban az akciós potenciál kialakulásához közvetlenül szükséges a G-fehérje közvetítette jelátviteli út vonal. A G-fehérjék három alegységből állnak és másodlagos hírvivőrendszereket aktiválnak az intracelluláris térben. Az antennából kimutathatóak Gα alegységek, főként Gαq, de azok nem a szagló receptor neuron dendritjeiben koncentrálnak, vagyis nem a szagló receptor fehérjékkel működnek együtt. Mégis a Gαq hiánya károsodást okozhat néhány, szaganyag kiváltotta viselkedésben (Benton és mtsai. 2006). Kísérletek szerint G-

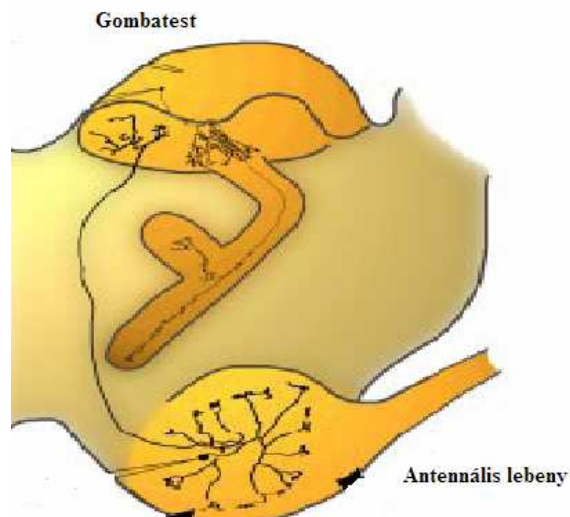
fehérje jelátviteli útvonal hiányában az EAG (electroantennograf) jel amplitúdója csökken a szaganyag típusától és koncentrációjától függetlenül (Chatterjee és mtsai. 2009). Lehetséges, hogy a G-fehérjék közvetítette jelátviteli útvonalak, csak homeosztatisz szabályzó szereppel bírnak, vagy a receptor ioncsatorna szabályzásában vesznek részt (Spehr és Munger 2009, Ha és Smith 2009).

A különböző rovar fajok között is konzervált szerkezetű OR83b-nek nem csak mint ion csatornának van fontos szerepe a szaglásban. Az endoplazmatikus retikulumban az OR83b, mint dajka fehérje (chaperon) működik, az adott érzékelő neuronban kifejezett szagló receptor fehérjét megfelelő térszerkezetbe tekeri, stabilizálja. Mikor a receptor fehérje felvette a megfelelő szerkezetet, az ER-ből való kilépését is az OR83b szabályozza. Az OR/OR83b komplexek a primer érzékelő neuronok (csillókkal megnövelt felszínű) dendritjének membránjában helyezkednek el. Az OR sejtmembránba jutásához OR83b szükséges, mely azonban az OR-hez való kapcsolódás nélkül is képes a membránba jutni (Benton és mtsai 2006). Nagyon sokféle OR fehérjét írtak le a különböző rovar fajokban. Annak azonosítása, hogy ezek pontosan milyen építőpokra, milyen kémiai anyagokra specifikusak intenzív kutatás tárgya, mivel specifikus ölü és csalogató szerek kifejlesztésének kulcsa lehet. Kukoricamolyokkal végzett vizsgálatok (Kárpáti 2007) során például kukoricából és vadkomlóból azonosítottak illatanyagokat, mint például alfa-ilangén, alfa-kopaén, dekanal, beta-kariofillén, metil-szalicilát, melyeket később a kukoricamolyok csapdázására használtak.

A gödör szőrök szagló receptor neuronjaiban (coeloconic sensilla) nem fordul elő az OR83b. Ezekben a receptor neuronokban a szaganyag kémiai detektálását ionotróp glutamát receptorokhoz hasonló szerkezetű ion csatornák (IR) végzik. Ezek az ionotróp receptorok nem képeznek komplexet és nem fejeződnek ki együtt az OR83b-vel. Hasonlóan az OR családba tartozó receptorokhoz, az ugyanazt az IR-t kifejező receptor neuron axonjai ugyanazt a glomerulust idegzik be. (Ha és Smith 2009, Benton és mtsai. 2009).

3.2.3 Az antennális lebeny

Az antennális lebeny a rovar agydúc két oldalán helyezkedik el a középagyban (deuterocephalon) (Zboray 1998, Vigh és Kondics 1997). Az antennából jövő érző idegrostok idegzik be. Az ugyanazt a receptort kifejező szagló receptor neuronok ugyanazt a glomerulusát idegzik be. A glomerulusokat központi rostaállomány veszi körül, mely a glomerulusok neuronjainak axonjaiból szerveződött ideg kötegeket tartalmazza. Az innen kiinduló pályák a gombatesteket idegzi be (5. ábra).



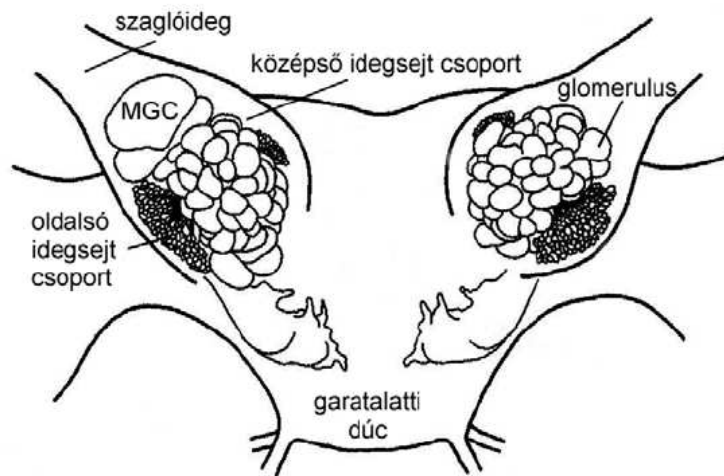
5. ábra. Az antennális lebeny és a gombatest

Az antennális lebeny projekciós neuronjai a gombatestet idegzik be, ahol kialakul az ingerre adandó válasz (Wehr 1999).

A glomerulusok száma fajonként változó tulajdonság. Általában annyi glomerulus található az antennális lebenyben, amennyiféle szagló receptor neuront fejez ki az adott faj. *Drosophylában* 50 körül, káposztalepkénél (*Pieris brassicae*) 60, házi méhnél 160, malária szúnyog (*Anopheles gambiae*) 60 glomerulust mutattak ki (Kárpáti 2007, Robertson és Wanner 2006, Hansson 2002).

Hártyás szárnyúaknál (Hymenoptera) és lepke fajoknál (Lepidoptera) vannak nemek közit különbségek az antennális lebeny felépítésében (Kárpáti 2007). Azoknál a fajoknál, ahol a nőstény ivari feromont termel, a hím antennális

lebenyében általános glomerulusok találhatóak és az úgynevezett makroglomeruláris komplex (MGC), mely az antennális lebenyben, a szaglóideg belépésénél helyezkedik el. Több glomerulusból is állhat és a feromonok felfogásáért felelős. A MGC-t beidegző szagló receptor neuronok specifikus feromon receptorokat termelnek. (Lei és Vickers 2008) (Hansson 2002),(Mizunami és mtsai. 2004).



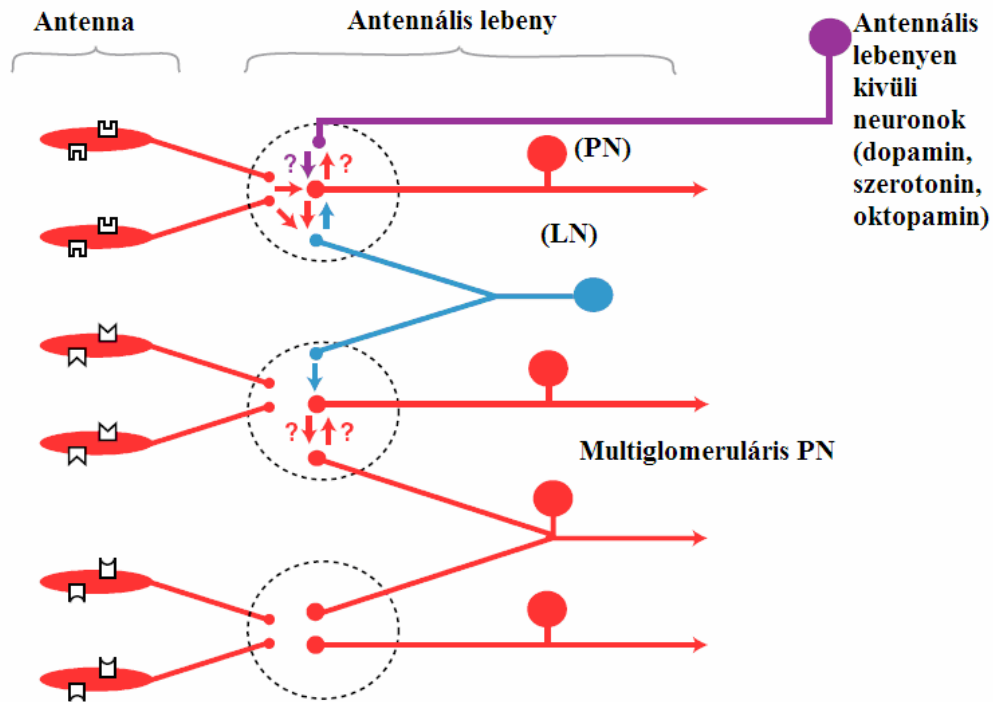
6. ábra. A makroglomeruláris komplex elhelyezkedése a hím dohány szender antennális lebenyében (Kárpáti 2007).

Az antennális lebeny két fő neuron típusa, az úgynevezett projekciós és helyi neuronok, a glomerulusokban képeznek szinapszist a szagló receptor neuronok axonjaival (Masse és mtsai 2009, Wilson és Mainen 2006).

A projekciós neuronok (PN) az axonjaikat a gombatestek, a legfelsőbb érző és asszociációs központok felé (illetve a proto-cerebrum laterális felébe az oldalsó szarvba) küldik. A projekciós neuronok dendritjei is képesek egymással szinapszist képezni, ezáltal gátolni vagy serkenteni egymást.

A másik neuron típus az ún. helyi neuron (LN), mely nem csak a szagló receptor neuronoktól, de projekciós neuronoktól is kap bemenetet, és szintén lehet gátló vagy serkentő. A helyi neuronok csak az antennális lebenyben képeznek

szinaptikus kapcsolatokat, és egy-egy helyi neuron több glomerulust is beidegez.
(Masse és mtsai 2009, Wilson és Mainen 2006).



7. ábra. Az antennális lebeny interneuronjai

Az ugyanazt a specifikus receptor fehérjét kifejező szagló receptor neuronok axonjai ugyanazt a glomerulust idegzik be, ahol projekciós és helyi neuronokkal képeznek szinapszist. a projekciós neuronok axonjai a gombatestekbe fut, ahol kialakul a válasza. Helyi neuronok gátló és serkentő szinapszissokkal befolyásolják az információáramlást. Az antennális lebenyt kívülről beidegző neuronok axon terminálisaiból dopamin, szerotonin, oktopamin szabadulhat fel, melyek a glomerulusok aktivációs mintázatát befolyásolják (Wilson és Mainen 2006).

Neurotranszmitterek az antennális lebenyben:

A szagló receptor neuronok kolinerg szinapszissokat képeznek a helyi és a projekciós neuronok dendritjein. A GABAerg gátló helyi neuronok preszinaptikusan gátolják a jelátvitelt a szagló receptorok és a projekciós neuronok között, míg a serkentő helyi neuronok kolinerg szinapszissokat képeznek a projekciós neuronok dendritjein. Az antennális lebenyen kívülről érkező idegrostok (pl a garatalatti dúc neuronjaiból) különböző neurotranszmitterekkel, mint például dopamin, octopamin, serotonin szabályozzák az információáramlást (Masse és mtsai 2009), (Wilson és Mainen 2006).

Információ feldolgozás az antennális lebenyben:

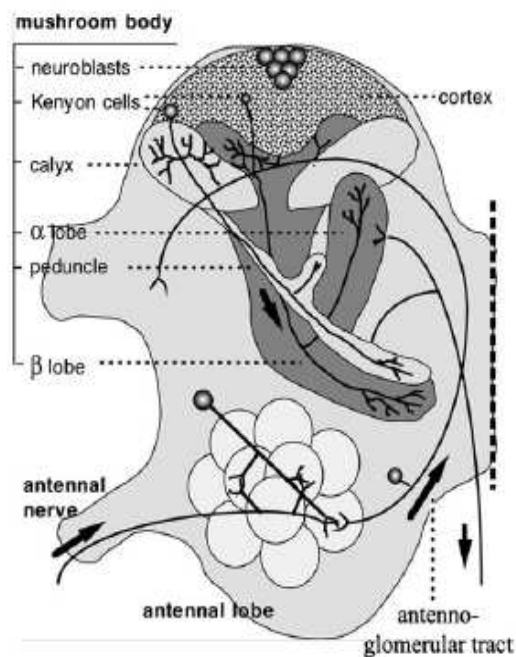
Az ugyanarra az epitópra érzékeny szagló receptor neuronok axonjai ugyanabba a glomerulusba konvergálnak (7. ábra). *Drosophyla* esetében körülbelül 50 szagló receptor neuron fejezi ki ugyanazt a receptort és küldi az axonjait ugyanabba a glomerulusba. Egy glomerulushoz maximum 3 projekciós neuron tartozik. Egy bizonyos szaghoz vagy illathoz több epitóp tartozik, melyekről az információ más-más glomerulusba jut. Minden szag, illat egyedi glomeruláris aktivitás mintázattal rendelkezik, vagyis minden szaghoz tartozik egy egyedi epitóp térkép, amit egy egyedi glomerulus aktivitás mintázat kódol. A projekciós neuronok a glomerulusok kimenetei. Tehát egy szag megfeleltethető a projekciós neuronok aktivációs mintázatával. A szag leképezése az antennális lebenyben mégsem statikus (Masse és mtsai 2009, Wilson és Mainen 2006). A glomerulusok a projekciós és helyi neuronok által képesek gátolni vagy serkenteni egymást, ezáltal olyan glomerulus is aktiválódhat, amihez nem érkezik közvetlenül stimulus, de az is előfordulhat, hogy egy olyan glomerulus esik ki az aktivációból egy kis idő után, ami a receptor neuronok felől ténylegesen kapott stimulust. Ez az aktivációs mintázat változás a stimulus után pár száz msec-al történik. Előfordulhat, hogy egy adott faj számára két, hasonló epitóp térképpel rendelkező szag is fontos a túlélés szempontjából, az élőlénynek érdeke, hogy minél jobban szétváljon a két illat reprezentációja egymástól. Tehát ennek az úgynevezett lassú időbeli mintázatnak (slow temporal pattern) fontos szerepe van a hasonló aktivációs mintázatok elkülönítésében, az átfedés mértékének csökkentésében (Masse és mtsai 2009),(Wilson és Mainen 2006).

3.2.4 A gombatest, mint asszociációs központ:

A gombatest (*corpora pedunculata*) páros struktúra ami a rovar agyduc protocerebrális részében foglal helyet (Zboray 1998). Az információ feldolgozásáért a Kenyon sejteknek nevezett interneuronok felelnek, melyek

dorsalisan, a cortexben csoportosulnak (8. ábra). A Kenyon sejtek dendritjei az úgynevezett calyxba nyúlnak, ami a gombatestet alkotó neuropiléma felső kiszélesedő része. A kenyon-sejtek axonjaikat a gombatest nyelébe (pedunculi) küldik. A calyx az a struktúra, ahol a Kenyon-sejtek dendritjei kapják a szenzoros bemenetet. A neuropiléma a nyélben folytatódik, amely a legtöbb faj esetében α , β , γ lebenyekre oszlik (Farris 2008). A lebenyek kapcsolódnak az efferens rostokhoz. A gombatestben történik az érzékszervek, receptorokból érkező információ feldolgozása, társítása a válasz kialakítása. Az antennális lebenyből az információ a calyx felé halad, mint ahogy a lobus opticus és a tapogatók felől a vizuális és mechanikai ingerek is.

A cortex csúcsán neuroblastok találhatóak, amelyekből folyamatosan újra képződnek az interneuronok (méheknél, vándorsáskáknál és *Drosophylánál* nem sikerült bizonyítani) (Cayre és mtsai. 2007). A folyamatos hullámokban képződő Kenyon sejtek koncentrikus rétegeket képeznek a cortexben. A külső rétegekben találhatóak az idősebb sejtek, míg a belső rétegekben a fiatalabb sejtek foglalnak helyet. A calyx felé eső nagyobb sejtek embrionális eredetűek és axonaik a γ lebenybe nyúlnak. A kisebb, már kifejlett korban képződött interneuronok axonjai részt vesznek az α és β lebeny kialakításában.



8. ábra A gombatest felépítése A gombatestben történik az érzékszervek, receptorokból érkező információ feldolgozása, társítása a válasz kialakítása. Az antennális lebenyből érkező információt az azonos oldali gombatest kenyon-sejtjei dolgozzák fel (Cayre és mtsai 2007).

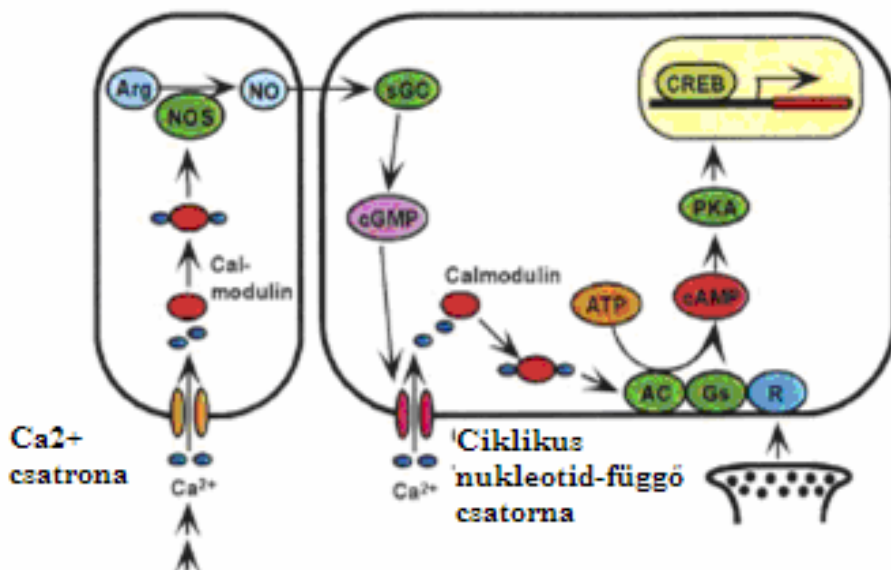
A gombatestben történik az érzéki információk asszociációja, értékelése, valamint az információ tárolása. Az idegrendszer információt tárol a szinaptikus kapcsolatok, valamint a neuronok ingerelhetőségének változásával. Rövid-távú memória kialakulása során a szinaptikus kapcsolatok, bizonyos fehérjék kovalens modifikációjával (pl foszforilációjával) gyors átalakulásra képesek. A hosszú-távú memória kialakulásához bizonyos gének transzkripció, transzláció szabályozása szükséges (Matsumoto és mtsai. 2006). A kenyon sejtek felelnek az információ feldolgozásáért, ioncsatornáikat neurotranszmitterek szabályozzák, melyek befolyásolják az ioncsatornák nyitási valószínűségét. A nyitási valószínűség megváltozása hatással van a neuronális ingerelhetőségre.

Neurotranszmitterek a gombatestben

A gombatestben hasonló neurotranszmittereket által indukálta folyamatokat írtak le, mint az antennális lebenyben. A neurotranszmitterekhez kapcsolódó folyamatokat bővebben itt tárgyalom a gombatest érzékelésben játszott központi szerepe miatt, és mivel a legtöbb fiziológiai, farmakológiai mérést itt végezték.

Nitrogén-monoxid (NO)

A szervezeten belül keletkezett NO a sejteken belül másodlagos hírvivő, de a sejtmembránon átdiffundálva az intercelluláris kommunikációban is részt vehet (Világi 2003). Feltételezések szerint, a NO a külső Kenyon-sejtekben termelődik, majd diffundál a beljebb elhelyezkedő interneuronok felé (9. ábra), (Matsumoto és mtsai 2006). A *Gryllus bimaculatus* esetében kimutatták, hogy NO-nak fontos szerep jut a hosszú távú memória kialakulásában. Szerepe lehet a CREB (cAMP responsive element) transzkripció faktor foszforilációjában, ezáltal hosszú-távon megváltoztatva a Kenyon-sejtek működését.



9. ábra NO hatása a neuronokban

A külső Kenyon-sejtekben termelődött NO átdiffundálva belsőbb elhelyezkedésű Kenyon-sejtek felé részt vesz a hosszú távú memória kialakulásában(Matsumoto és mtsai. 2006).

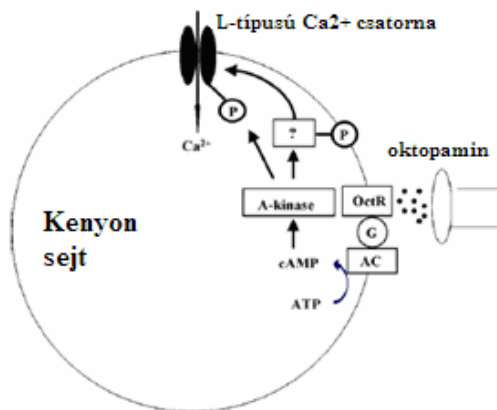
A NO argininből képződik a Nitrogén-monoxid-szintáz (NOS) által katalizálta folyamatban. A NOS-nak az aktiválódáshoz foszforilálódnia kell, amihez a Ca^{2+} /kalmodulin (Ca/CaMK) szükséges. A keletkező NO átdiffundál a célsejt membránján, ami cGMP szint növekedést indukál. A cGMP megnöveli a ciklikus nukleotid-függő ioncsatornák nyitási valószínűségét. A beáramló Ca^{2+} a kalmodulin kinázhoz kötődik, majd a Ca^{2+} /CaMK aktiválja a Ca^{2+} /CaMK függő adenilát cikláz. Ennek hatására a cAMP szint megnő, ami serkenti a Protein Kináz A-t (PKA). A PKA foszforilálja végül a CREB transzkripció faktort (Matsumoto és mtsai 2006).

Oktopamin:

A gerinctelen állatokban előforduló biogén amin, receptorhoz kötődve befolyásolja a Ca^{2+} csatornák nyitási valószínűségét, valamint cAMP-szint növekedést indukál (Világi 2003).

Méhek estében a garatalatti dúc (ganglion suboesophageale) interneuronjai, a ventrális páratlan medián neuronok (VUM) szabadítják fel az oktopamint. Ezen

neuronok kétoldalt szimmetrikus csoportokba tömörülnek (Kosakai és mtsai. 2008).



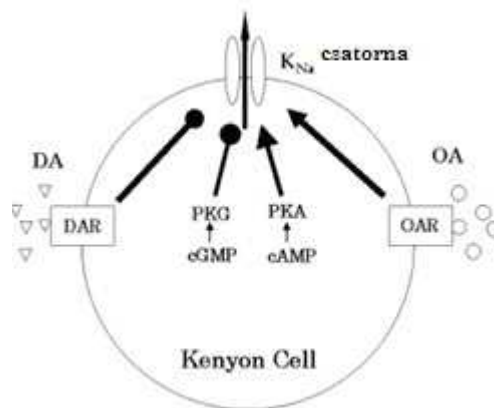
10. ábra Oktopamin hatása az L-típusú Ca²⁺ csatornára

Az oktopamin bekötődése az oktopamin receptorhoz, ami konformáció változást eredményez a receptor fehérjében. Ennek hatására a G fehérje kapcsolódni képes a receptorhoz és aktiválódik. A GTP-t kötött α -alegység aktiválja az adenilát ciklázot, ami serkenti a cAMP ATP-ből való képződését. A megnövekedett cAMP koncentráció a protein kináz A-t aktiválja. PKA az L-típusú Ca²⁺ csatorna foszforilálásával csökkenti annak nyitási valószínűségét (Kosakai és mtsai 2008).

A *Gryllus bimaculatus* esetében kimutatták, hogy a Kenyon-sejtek Ca²⁺ (L-típusú DHP-szenzitív) csatornái az egyik célfehérje az oktopamin számára (10. ábra). A receptorához való bekötődés után a cAMP szint megnövekszik, ami aktiválja a protein kináz A-t, ami foszforilálja az L-típusú Ca²⁺ csatornát és ezzel csökkenti a nyitási valószínűségét (Kosakai és mtsai 2008). A preszinaptikus membránban Ca²⁺csatornákat találunk, amik hozzájárulnak a neurotranszmittert tartalmazó szinaptikus vezikulák ürüléséhez (Világi 2003). Az L-típusú Ca²⁺ csatorna gátlása csökkentheti a Ca²⁺ beáramlást, ezáltal csökkenhet a Kenyon-sejtek neurotranszmitter felszabadítása is .

Dopamin:

A dopamin a biogén aminok közé tartozó neurotranszmitter, az oktopaminnal ellentétes hatást fejtenek ki a kenyon-sejtek Na⁺ aktiválta K⁺ csatornáinak működésére(11. ábra) (Aoki és mtsai. 2008)..



11. ábra Neurotranszmitterek hatása a Na⁺ függő K⁺ csatornákra (Aoki és mtsai 2008).
A dopamin bekötődése a dopamin receptorokhoz gátló hatást fejt ki Na⁺ függő K⁺ csatornákra, míg az oktopamin ezzel ellentétes hatást fejt ki, növeli a K⁺ csatorna nyitási valószínűségét.

A fiziológiai szerepe a K⁺ csatornáknak a Kenyon sejtekben még nem tisztázott. Más neuronális sejteknél a feszültségfüggő Na⁺ csatornákon való Na⁺ beáramlás egy akciós potenciál során a Na⁺ függő K⁺ csatornák átmenti aktivációját eredményezi. Az ezt követő K kiáramlás repolarizációt eredményez. A dopamin csökkenti a K⁺ csatorna nyitási valószínűségét és így az akciós potenciál lefutását meghosszabbítja. Ezzel szemben az oktopamin növeli a K⁺ csatorna nyitási valószínűségét, ami talán megrövidíti a Na⁺ függő akciós potenciál időtartamát, lefutását (Aoki és mtsai 2008).

Acetilkinolin:

A kenyon sejtekben található niktinos acetilkolinerg receptorok a posztszinaptikus membránban. Az acetilkolin az antennális lebeny projekciós neuronjai felől szállítja az információt (Cayre és mtsai. 1999).

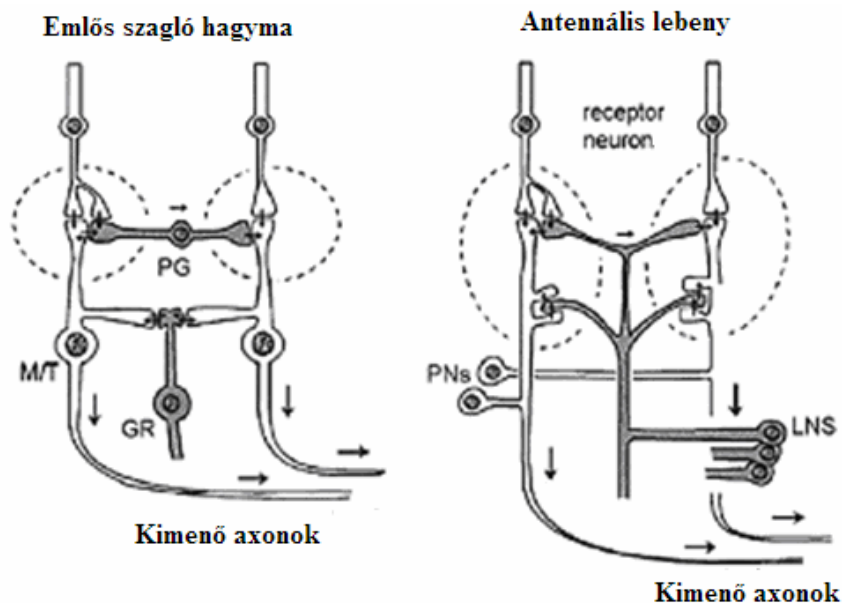
GABA:

A Kenyon sejtek posztszinaptikus membránjában található GABA receptorok. A projekciós neuronok felől jövő gátlást közvetíti a Kenyon sejtek felé (Cayre és mtsai 1999).

Információ feldolgozás a gombatestben:

Az egyik legfontosabb körülmény az információ feldolgozásban, hogy hány, különböző glomerulushoz tartozó projekciós neuron konvergál egyetlen Kenyon sejthez. Egységbe kell rendezni a rengeteg bejövő ingerületet, hogy kialakulhasson ezek eredőjeként az akciós potenciál. A Kenyon sejtek még specifikusabbak az epitópokra, mint a projekciós neuronok. Sok projekciós neuron konvergál kevés Kenyon sejthez.

3.3 Gerinces és rovar szaglórendszer összehasonlítása



12. ábra Hasonlóságok és különbségek az emlős és rovar szagló rendszerében.

M/T: Mitrális/pamacsos sejtek; PG: periglomeruláris sejtek; GR: szemcsés sejtek; PN: projekciós neuronok; LN: helyi neuronok (Ache és mtsai 2005)

A két struktúra hasonló felépítése konvergens fejlődés eredménye. A levegőben oldott kémiai anyagok érzékelése rovaroknak és gerinceseknek is egyaránt fontos a túlélés biztosításához, talán a hasonló igények hasonló strukturális megoldásokat szülnek. A gerincesek és a rovarok szaglórendszere anatómiai és funkcionális értelemben is hasonlítanak egymásra (12.ábra). Az emlősök szaglóhagymája is glomeruláris szerveződést mutat, a glomerulusok specifikusak, az azokat beidegző szagló receptor neuronokra, melyek egyféle szagló receptor fehérjét fejeznek ki. A

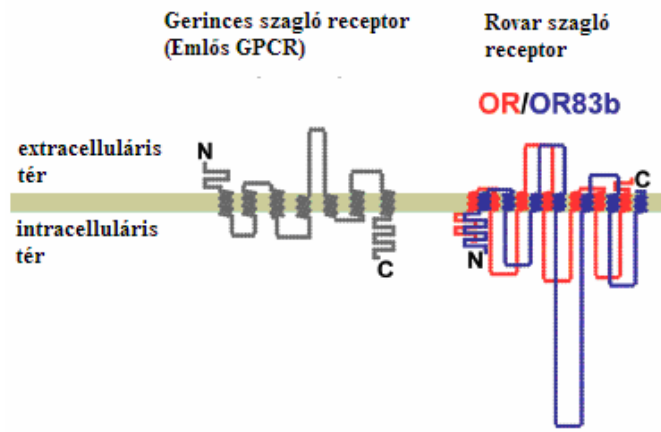
szaglóhagymába érkező információt a mitrális és pamacsos sejtek közvetítik a felsőbb agyi központok felé.

3.3.1 Szagló receptor neuronok gerincesekben

Az állatok sokféle epitópot, képesek receptoraik által érzékelni, vagyis olyan molekula részletet, melyet a szaglórendszer szagingerként képes felfogni. A különböző epitópok kombinációja határozza meg az érzet minőségét a gerincesek szagló rendszerében is (Fonyó és Ligeti 2008). A rágcsálóknál átlagosan több mint 1000, embereknél körülbelül 350-féle szagló receptor expresszáldhat a neuronokban (Spehr és Munger 2009). Mind a gerinces fajoknál, mind a rovaroknál a receptor neuronok csak egyféle epitópot megkötni képes receptor molekulát fejeznek ki. Az egy adott receptorral rendelkező szenzoros neuronok rovaroknál a szagló lebeny adott glomerulusába küldik az axonjaikat. Az emlősök szaglóhagymájában található, hasonló szereppel rendelkező funkciós egységet is glomerulusnak hívja a szakirodalom és ugyancsak az azonos receptoroktól származó ingerekre érzékeny, (Benton 2006), Felvetődik a kérdés, hogy vajon hogyan találják meg a receptor neuronok a megfelelő glomerulust? Emlősöknél írták le, hogy a szagló receptorok nem csak a neuronok dendritjeiben vannak jelen, hanem az axonban is kimutatható, aminek talán szerepe van abban, hogy az azonos receptor fehérjét kifejező szagló receptor neuronok axonjai megtalálják a megfelelő glomerulust. (Benton 2006), A receptor fehérjék szerkezete alapján vannak különbségek a gerincesek és rovarok között. Az emlősök receptorai a G protein kapcsolt receptorok (GPCR) szupecsaládjába tartoznak (Benton és mtsai 2006). Hét transzmembrán domeint tartalmaznak helikális szerkezettel. Az N-terminális a gerincesek szagló receptorainál extracellulárisan helyezkedik el, míg a C- terminális intracellulárisan. Rovarok esetében fordított a membránban a receptor fehérjék elhelyezkedése, azonban szintén több transzmembrán domeint tartalmaznak, (Spehr és Munger 2009, Touhara és Voshall 2009). A jelközvetítésben a cAMP-nek van fontos szerepe. A szaglás jelátviteli folyamata a szagmolekula bekötődésével kezdődik a specifikus receptorához az érzékelő neuron dendritjének külső felszínén. A szaglás jelátviteli folyamatai a receptor neuron dendritjeiben játszódnak le. Közvetlenül vagy közvetetten kötődik a nyálkában lévő szaganyag a kötő fehérjéhez, ami megköti a szagmolekulát, és

jelez a receptornak. Az ezt követő számos lépés receptor potenciált generál különböző ioncsatornák nyitásával.

Emlősök esetében az elsődleges útvonal ciklikus nukleotid függő ioncsatornákat tartalmaz. A szagló receptor neuronok szaglás specifikus G proteineket expresszálnak (Golf), melyek szaglás - specifikus adenilát ciklázot aktiválnak. A szagló receptor stimulálásával megnövekedik az adenilát cikláz szint a sejtben, ami Ca^{2+} és Na^{+} csatornákat aktivál. A depolarizáció eléri a dendritektől az axon dombig, ahol akciós potenciál generálódik, ami a szaglóhagymába továbbítódik (Fonyó és Ligeti 2008, Purves és mtsai. 2004).



13. ábra Gerinces rovar szagló receptorok (Benton és mtsai 2006 nyomán)

Az emlős és rovar szagló receptorok eltérő struktúrával rendelkeznek. Az emlősök receptor fehérjéi a GPCR –ok közé tartoznak, míg a rovarok szagló receptorai heterodimer szerkezetűek, és nem kapcsolódik hozzájuk G-fehérje. Az emlős szagló receptorok N-terminálisa az intracelluláris térben, C-terminálisa az extracelluláris térben helyezkedik el. Ehhez képest a rovarok receptor fehérjéi ellentétesen helyezkednek el a membránban.

Rovaroknál a specifikus receptor fehérje egy konstans, a szagló receptor neuronok többségében kifejeződő fehérjével, az ún. OR83b-vel képez komplexet. A komplex ioncsatornaként működik. A G-fehérje szerepe az információ tovább adásában nem bizonyított. (Vosshall 2001, Lundin és mtsai. 2007, Chatterjee és mtsai. 2009, Spehr és Munger 2009, Dupuy és mtsai. 2010)

3.3.2 Vomeronasalis szerv

Az ivari feromonok detektálására mind gerinceseknél mind a rovaroknál külön funkcionális egységek alakultak. Gerinceseknél a tokba zárt vomeronasalis szerv a szagló üreg alapi részében helyezkedik el. A legtöbb emlősben a VNO a járulékos szagló hagymába vetül, ami a hypothalamusszal kapcsolódik. A vomeronasalis szerv egy apikális és egy bazális rétegre osztható, melyek V1R és V2R receptorokat termelnek. V1R az apikális rétegben, V2R a bazális rétegben fejeződik ki. Emberek esetében a V1R gének hozzávetőlegesen 90 % pseudogén, tehát funkcióját veszítette. V1R receptorok egyes kutatások szerint feromon receptorokként működnek. Az ember szaglóhámjában is kifejeződnek V1R típusú receptorok, ami felveti a kérdést, hogy talán az ember párválasztásában is közrejátszik a szaglás. A V2R típusú receptorok pedig a nem illékony feromonok felismerésére alkalmas, mint például a peptidek és a fehérjék (Purves és mtsai 2004), (Spehr és Munger 2009), (Touhara és Vosshall 2009).

Rovarak feromon detektálásra való szerve a makroglomeruláris komplex, melyek hártyás szárnyúakra és lepkékre jellemzőek. Az ivari feromont termelő nőtény antennális lebenyében csak úgynevezett általános glomerulusok vannak, ezzel ellentétben a hímek rendelkeznek makroglomeruláris komplexel, melynek segítségével képesek érzékelni a nőtények által kibocsátott feromonokat.(Kárpáti 2007), (Robertson és Wanner 2006), (Hansson 2002).

3.3.3 Szaglógagyma

A gerincesek szaglógagymája bonyolultabb felépítésű, mégis hasonló funkcionális egységek különíthetők el benne, mint a rovarok antennális lebenyében. Ahogy a szagló receptor neuronok axonjai elhagyják a szaglógagymot, a kötegek egyesülve létrehozzák a szaglóideget . A szagló idegek az azonos oldali szaglógagymát idegzik be, melyek az azonos oldali előagy ventrális anterior felén található (Purves és mtsai 2004, Wehr 1999). A gerincesek szaglógagymája többretegű struktúra, ami általában 5 különböző rétegre oszlik. A glomeruláris réteg számtalan glomerulust tartalmaz, mely hasonló funkciót lát el, mint a rovarok esetében. Funkcionális egységek, melyek feladata az afferensek felől jövő információk integrálása és tovább küldése a felsőbb agyi központok felé. A glia réteggel körbeburkolt glomerulusokban találkoznak a receptor neuronok axonjai a mitrális, pamacsos és periglomeruláris sejtek dendritjeivel, melyek funkció alapján a rovarok projekciós és helyi neuronjaival analógok. Egymás kölcsönös gátlásával vagy serkentésével járulnak hozzá az információ feldolgozásához.

A mitrális sejtek sejtteste a mitrális rétegben, míg a pamacsos sejtek sejtteste a külső plexiform rétegben helyezkednek el. Emlősök esetében mind a kétfajta sejt az elsődleges dendritjeit csak egy glomerulusba küldi. (Halak, kételtűek és hüllőknél viszont ezeknek, a sejteknek összetett csúcsi dendritjei több glomerulusba is belépnek). Mindkét sejtípus alapi dendritje a külső plexiform rétegben ágaznak el. Mindkét sejtípus axonjai serkentő szinapszist képeznek, melyek a piriform kérget idegzik be. A periglomeruláris sejtek sejtteste a glomeruláris rétegben található. Elsődleges dendritjeiket a glomerulusokba küldik, ahol közvetlen bemenetet kapnak a receptor afferensektől. Dendritjeik a mitrális és pamacsos sejtek dendritjeivel képeznek szinaptikus kapcsolatot az adott glomerulusban. Az inhibitoros periglomeruláris sejtek axonjai elágaznak más glomerulusokba és a külső plexiform rétegben. A legmélyebb réteg a szemcsés sejtek rétege, ahol a szemcsés sejtek sejtteste található. A szemcsés sejtek is inhibitorosak és dendritjeik a külső plexiform rétegben ágaznak el (Purves és mtsai 2004, Wehr 1999).

3.3.4 A szagló kéreg

Az emlősök mitralis és pamacsos sejtjei a szagló kéreg piramis sejtjeivel létesítenek kapcsolatot. Ezért a szagló kéreg egyedi az érzékelő kéregek között, hiszen az információ minden más esetben a thalamuson keresztül éri el a kérget. A mitrális sejtek axonjai beidegzik az amygdalát. A szaglóideg fő célpontja a háromrétegű piriform kéreg a temporális lebeny ventromediális területén. A piriform kéreg neuronjai válaszolnak a szagokra specifikus mitrális sejtek ingereire. A piriform cortex magjai kapcsolatot létesítenek néhány thalamicus és hypothalamicus magcsoporttal, valamint a hippocampussal és az amygdalával. A piriform cortex néhány neuronja beidegzi az orbitofrontális kérget is (Purves és mtsai 2004, Fonyó és Ligeti 2008). Amint ez látható, a szagló kéreg a rovarok asszociációs központjához képest jóval bonyolultabb struktúra, és még a rovarok gombatestének működésében is rengeteg a felderítendő kérdés. A gerincesek szaglókérgének információ feldolgozásával a bonyolultságából adódóan nehéz kísérletezni, talán a rovarok szaglásának jobb megértése közelebb visz a gerincesek szaglórendszerének működésének megértéséhez (Purves és mtsai 2004, Fonyó és Ligeti 2008).

4 Módszerek

4.1 Az agydúc feltárása

A rovarok szagló apparátusának vizsgálatához modell állatnak sáskát (*Schistocerca* sp.) választottuk, a kitin kutikula könnyen eltávolítható volt és a zsírtetek (*corpus adiposus*) színe is jól elkülönült a többi szövetből, ami nagyban megkönnyítette az agydúc azonosítását. Ezenkívül a sáska szagló lebenye fejlett, jól azonosítható. Az agydúc eltávolítása előtt a levágott fejet üveglapra ragasztottuk, melyet fiziológiás sóoldattal telt petri csészébe merítettünk. A disszekciót sztereo mikroszkóp alatt végeztük.

4.2 Metszetkészítés

Az agydúc eltávolítása során átvágtuk a garatidegyűrűt és eltávolítottuk a zsírteteket. A kipreparált agydúcot formalinban fixáltuk egy napig. A fixálás célja, hogy a sejtek, szövetek fehérjéit denaturáljuk és megállítsuk az enzimatisz bomlási folyamatokat. A fixálást követte a víztelenítés, melyre szükség van, mert a paraffin nem elegyedik a vízzel. A víztelenítés felszálló alkohol sorban történik, vagyis a hígabb oldatoktól az egyre töményebb oldatok felé haladunk.

Az agydúc 50%-os, 70%-os, 96%-os alkohol oldatokban 30-30 percet töltött el, majd abszolút alkoholban 45 percet. Az alkohol sor után olyan anyagra van szükség, ami a paraffinnak oldószere, de alkohollal elegyedik. Ez az anyag a xilol volt, amiben az agydúc újabb 30 percet állt. A xilol átjárja a szövetet, ami üvegszerűvé és tömörebbé válik. Az így előkészített anyagot 50⁰C-os folyékony paraffinban hagytuk 4 órán keresztül, hogy a paraffin átjárja a szövetet.

Ezután került sor a kiöntésre, a kiöntő formába kb. 3-ad részig paraffint öntöttünk, miután megszilárdult, megfelelő pozícióba helyeztük az agydúcot, majd a formát színültig töltöttük paraffinnal, mikor már egy kicsit megszilárdult hideg vízben hűtöttük, majd metszésig hűtőben tároltuk.

A metszést Reichert-gyártmányú szánkás- mikrotommal végeztük. Az agydúcból 8-10 µm-es szeleteket vágunk. A levágott metszeteket ecsettel 50⁰C-os desztillált vízfelületre terítettük, majd tojásfehérjével kezelt tárgylemezre húztuk. A

tárgylemezeket pár perc szárogatás után 37⁰C-os termosztátba helyeztük, így a metszetek jobban letapadtak, illetve kisimultak. A festési eljárás másnap következett (Kovács 2007).

(<http://www.nyf.hu/biologia/sites/www.nyf.hu.biologia/files/Hisztotechnika.pdf>)

4.3 Szöveti festések

A festési eljárások fizikai-kémiai kölcsönhatásokon alapulnak. A festékek és a megfesteni kívánt anyag savas-bázikus jellege meghatározza, hogy mit mivel érdemes festeni. Kombinált festési eljárások segítségével a sejtmagok és egyéb szövet elemek könnyebben elkülöníthetők (Kovács 2007).

4.3.1 Haematoxin-eosin festés

A kettős festési eljárás során a sejtmagok kékes színt öltenek, míg más szövetelemek rózsaszínes-piros színt kapnak. A haematoxin a sejtmagokat festi meg, bázikus jellegű, ezért a festékmolekulák a sejtmagban található nukleinsavakhoz kapcsolódnak. Az eosin savas festék és a citoplazma fehérjéihez kötődik (Kovács 2007). A festési eljárás lépéseit a 1. Táblázat tartalmazza.

	Lépés	idő
1	xilol	3 perc
2	xilol	3 perc
3	xilol	3 perc
4	abszolút etanol	1 perc
5	96%os etanol	2 perc
6	70%os etanol	2 perc
7	desztillált víz	1 perc
8	haematoxin	10 perc
9	kékítés	3 perc
10	eosin	7 perc
11	öblítés csapvízben	3 mperc
12	80%os etanol	1 perc
13	96%os etanol	1 perc
14	abszolút etanol	1 perc
15	csepegtetés	2 perc
16	terpenol+xilol(1:1)	2 perc
17	xilol	2 perc
18	xilol	2 perc

1. Táblázat. Haematoxin-eosin festés menete. A xilol a paraffin kivonását szolgálja, majd ezt követi az egyre hígabb alkohol sor és a desztillált víz, ami megakadályozza, hogy a festés során a metszet károsodjon a gyors vízfelvétel miatt. A festést követően egyre töményebb alkohol oldatokba helyeztük a metszetet, hogy a felesleges vizet kivonjuk. Ezt követően ismét xilollal kezeltük, hogy a metszet homogén fénytörésű legyen.

4.3.2 Cresyl -ibolya festés

A Cresyl-ibolya festési eljárás, ami a sejtmagokat és az endoplazmatikus retikulumot ibolya színűre festi. Általában kombinált festési eljárásokkal együtt használják. A festési eljárás lépéseit a 2. Táblázat tartalmazza (http://ichworld.com/_protocols/special_stains/nissl-frozen-sec)

1 Cresyl	45 másodperc
2 öblítés csapvízben	3 másodperc
3 80%-os etanol	1 perc
4 96%-os etanol	1 perc
5 abszolút etanol	1 perc
6 csepegtetés	2 perc
7 terpenol+xilol(1:1)	2 perc
8 xilol	2 perc
9 xilol	2 perc
10 Lefedés	

2. Táblázat. Cresyl-ibolya festés menete. A deparaffinálás és az egyre hígabb alkoholsor után a metszeteket, 10%-os Cresyl-ibolya festékkel kezeltem, amit víztelenítés követett, majd újabb Xilol kezelés a jobb fénytörés érdekében.

Az utolsó lépés a metszet lefedése. A fedőlemezre csepegtettünk egy csepp xilolt hogy a kanadabalzsam jobban szétterüljön. Majd bonctű segítségével óvatosan ráengedtük a fedőlemezt a tárgylemezre

A megfestett metszeteket Zeiss standard mikroszkóppal vizsgáltam.

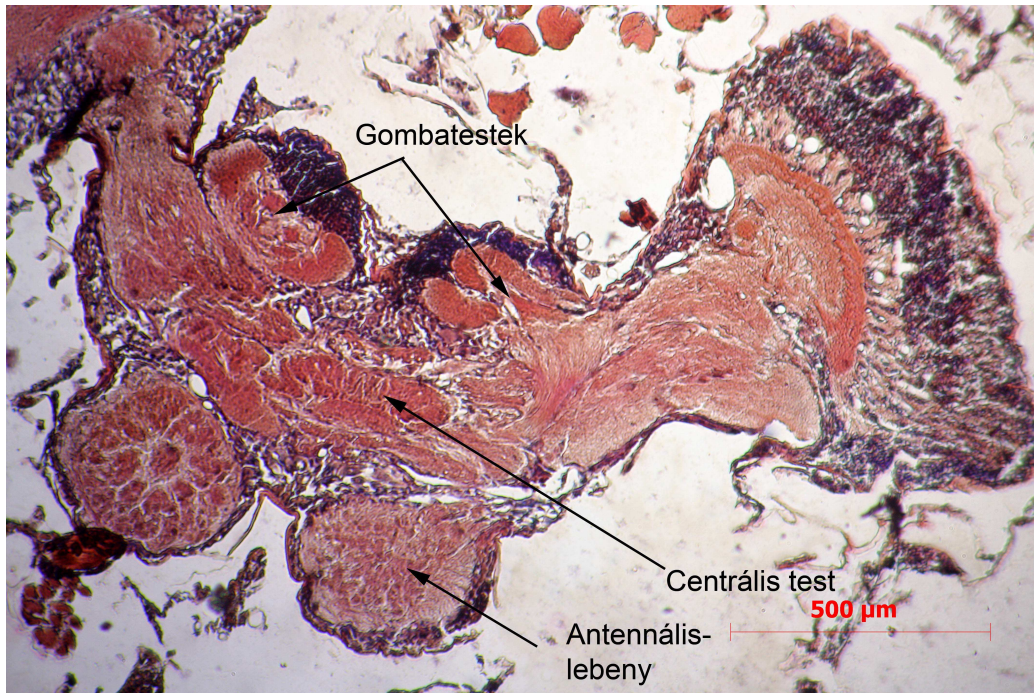
4.4 Elektrofiziológia

A sáska agydúcát szabaddá tettük az elektróda számára, eltávolítottuk a kitin és a zsírtesteket. Ezután az elektródát az antennális lebenybe vezettünk, a sáska azonos oldali antennáját pedig a stimulátorba helyeztük. Az extracelluláris mérésekhez 50 µm vastag hegyezett wolfram elektródát, a stimuláláshoz 0.2 mm vastag bipoláris ezüst elektródát használtunk. A méréseket a Supertech kft. (Pécs) által gyártott BioAmp kétcsatornás erősítővel végeztük. A stimuláló berendezés a szintén a Supertech kft. által gyártott Biostim volt. A jeleket CED1401 plusz típusú analóg digital converterrel digitalizáltuk. A méréseket a Spike2 programmal végeztük és dolgoztuk fel. Az elektródákat Newport (NJ) háromdimenziós manipulátorral pozicionáltuk. A jeleket 2 kHz-en szűrtük, a mintavételezési frekvencia 5 kHz volt. A kiváltott válaszokat a stimulusra szinkronizáltuk és átlagoltuk.

5 Eredmények

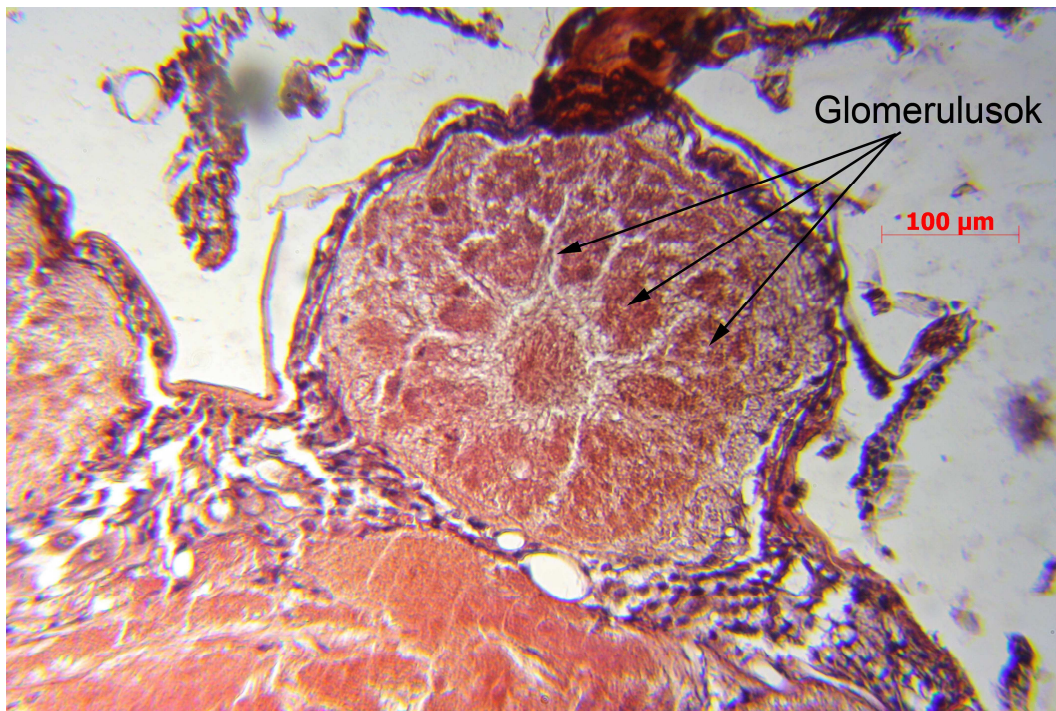
5.1 Hisztológia

A paraffinos metszési eljárás és a haematoxin-eosin festés rutin módszereknek számítanak a hisztológiában. Ennek ellenére a módszerek beállítása során számos nehézségbe ütköztünk, optimalizálnunk kellett az eljárások lépéseit, amíg kielégítő minőségű metszeteket nem tudtunk készíteni. Úgy találtuk, hogy 8-10 µm vastag szeletek az optimálisak a mi céljainkra. A 14. ábra, 15. ábra és a 16. ábra mutatja a sáska agydúcának haematoxin-eosinnal festett metszeteit különböző nagyítások mellett. Ez a festési eljárás kitűnően kiemeli a neuronok sejttestjeit (sötétlila) valamint a neuropilémát (rózsaszín). A 14. ábrán kitűnően látszanak azok a struktúrák, amik a szaglás folyamatában, valamint a szaginformáció feldolgozásában részt vesznek (az antennális lebeny glomerulusai, a centrális test és a gombatestek).



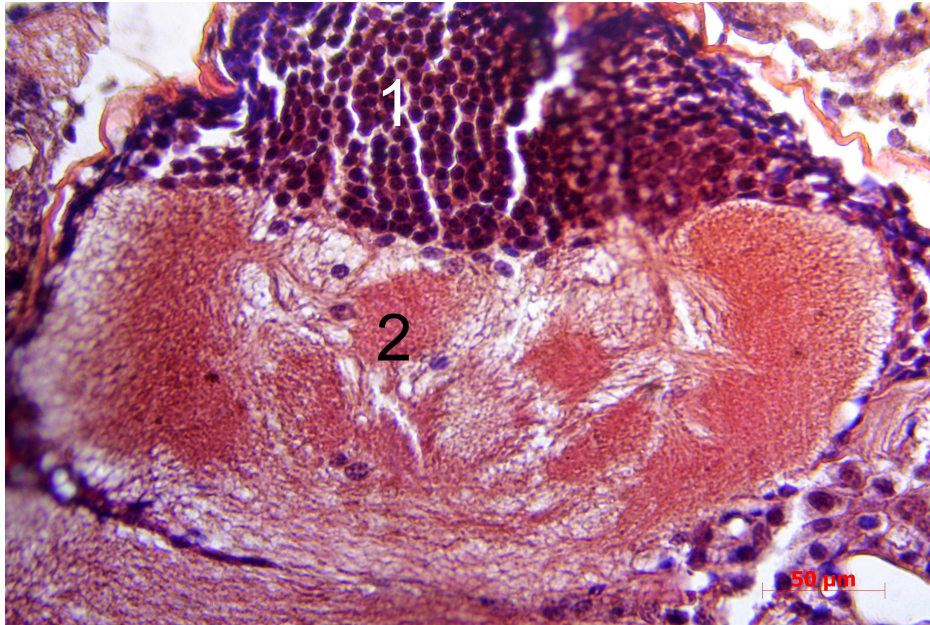
14. ábra. Sáska haematoxilin-eosinnal festett agydúcának frontális metszete. Az előagyi területek jól megfigyelhetők. A protocerebrum laterális részét a látó lebenyek alkotják. Az összetett szemekből jövő információt a nyíllal jelölt gombatestek dolgozzák fel. A gombatestekből kiinduló leszálló pályák a jelölt centrális testben kereszteződnek. A középagy részeként az antennális lebeny (nyíl) jól azonosítható. Az utóagyi területek a középagy mögött-alatt helyezkednek el, így a képen nem láthatók.

A 15. ábra a glomerulusok szerkezete figyelhető meg. Jól látszik, hogy a helyi és a projekciós neuronok sejttestjei a glomerulusok szélén helyezkednek el, a glomerulusokat ezeknek a sejteknek a dendritjei alkotják, melyek szinapszist képeznek a szagló receptor neuronok axonjaival. Egy adott szagot, illatot több epitóp határoz meg. Az azonos receptort kifejező (ugyanarra az epitópra érzékeny) neuronok ugyanazt a glomerulust idegzik be. A glomerulusok projekciós neuronjai is specifikusak egy-egy adott epitópra. Minden egyes epitópról az információ adott glomerulusba jut, tehát a szagokhoz tartozik egy meghatározott glomerulus aktivitás mintázat.



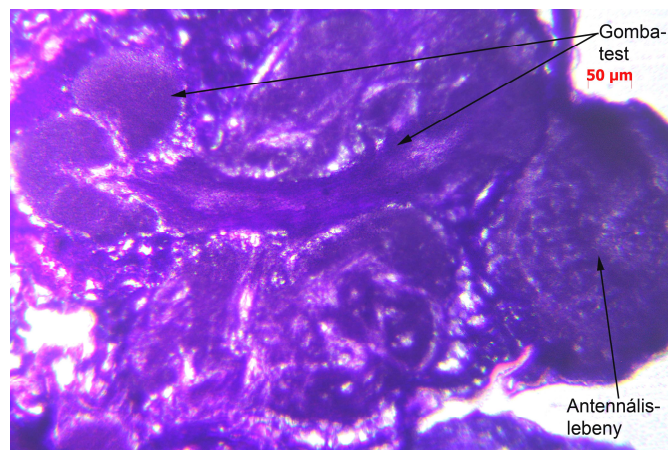
15. ábra Antennális lebeny. A glomerulusok jól láthatóak. A szagló receptor neuronok axonjai itt képeznek szinapszist a projekciós és helyi neuronok dendritjeivel. A sáskáknál nem figyelhető meg a makroglomeruláris komplex, ami nem jelenti feltétlenül, hogy nem használnak feromonokat a nemek közti kommunikációban.

A 16. ábra a gombatestet mutatja haemotoxilin-eosinnal megfestve. A gombatestben történik receptorokból érkező információk feldolgozása, társítása és a válasz kialakítása. Az antennális lebenyből az információ a calyx felé halad. A projekciós neuronok axon terminálisai a kenyon sejtek dendritjeivel képeznek szinapszist. A kenyon sejtek meghatározott projekciós neuron mintázatra reagálnak (és így meghatározott glomeruláris mintázatra is), tehát specifikusak az adott illatanyagra.



16. ábra Gombatest. Csak a gombatest dorsális fele látható. 1: kenyon sejtek, melyek a különböző érzékelő neuronok felől jövő információ feldolgozásáért felelnek. A kenyon sejtek dendritjei az úgynevezett calyxba (gomba kalapja) (2) nyúlnak. Itt kapják a kenyon sejtek dendritjei a szenzoros bemeneteket.

A 17. ábra sáska agydúcát cresyl-ibolya festéssel mutatja. Ez a festési módszer egy kontraszt festés, általában más festési eljárásokkal kombinálva használják. Nagyon jól kiemeli a neuronok sejttestjeit és projekcióikat. Az ábrán a gombatest és az antennális lebeny látható.



17. ábra. Sáska agydúca cresyl-ibolyával festve. Az antennális lebeny projekciós neuronjai axonjaikat az azonos oldali gombatestekbe küldik.

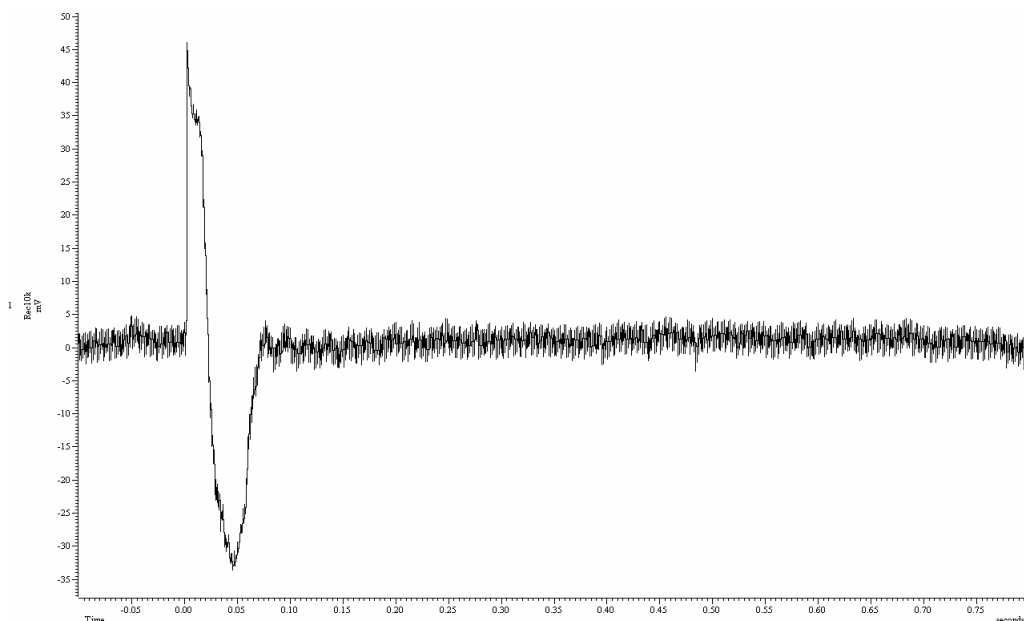
5.2 Fiziológia

Sáska szaglőrendszerének fiziológiai működését extracelluláris elektrofiziológiai módszerekkel vizsgáltuk. Egy fém elvezető elektródát helyeztünk az antennális lebenybe, míg az antennát elektromosan stimuláltuk. A mérő elektróda elhelyezkedését a 18. ábra mutatja.



18. ábra. Eletrofiziológiai mérési elrendezés. Az extracelluláris elektródát az antennális lebenybe helyeztük. A stimuláló elektróda a képen kívül, az antennán volt (20x nagyítás). Jól megfigyelhető az antenna és az antennális lebeny.

Az antenna stimulálásával az antennális lebenyben mérhető kiváltott válaszokat a 19. ábra mutatja. Az extracelluláris field potenciál amplitúdója nagyobb volt, mint 10 mV, a stimulus erősségével növekedett, de a késői, negatív komponenst csak egy bizonyos stimulációs küszöb felett lehetett megfigyelni. A kiváltott válasz alakja függött az elvezető elektród pozíciójától. Oszcillációt nem figyeltünk meg az antennális lebenyben.



19. ábra. Kiváltott válasz az antennális lebenyből. Az antennát elektromosan stimuláltuk, miközben az antennális lebenyből extracelluláris field-potenciálokat mértünk, a jeleket a stimulusra szinkronizáltuk és átlagoltuk.

6 Megvitatás

A dolgozatban összefoglaltuk a rovarok szaglásának folyamatát a témában megjelent szakirodalom alapján, valamint összehasonlítottuk a gerincesek és rovarok szaglását. Az összegyűjtött irodalom mutatja, hogy a rovarok szaglása széles körben kutatott terület, a kutatások elsősorban mezőgazdasági és környezetvédelmi célokat szolgálnak. Ezen kívül számos fiziológiai és molekuláris biológiai tanulmány foglalkozik a rovarok szaglásával, mivel rovarok a tanulás és memória folyamatainak példa állatai. Sok kérdés azonban még megválaszolatlan, például hogy a rovarok által érzékelt illatanyagok milyen kémiai tulajdonságokkal rendelkező molekulák, és hogy a specifikus receptor fehérjék, e molekulák mely epitóbjaira érzékenyek. Az antennális lebenyben történő információ feldolgozás is egy intenzíven kutatott terület. Nem világos, hogy az antennális lebenyben ható neurotranszmitterek, milyen ioncsatornákon fejtik ki hatásukat és hogyan történik felszabadulásuk szabályozása. Történik-e vajon visszacsatolás a gombatest felől? A gombatest működésével kapcsolatban is több a kérdőjel, mint a konkrétum. A kenyron sejtek szabályozása, a memória kialakulásának folyamata még tisztázásra vár.

A kísérletes munka beállításánál nehézséget okozott, hogy egyetemünkön nem voltak hagyományai az ilyen típusú *in vitro* kísérletes munkának, így minden rendszert alkatrészekből kellett összeállítanunk, a kísérleteket beállítanunk és optimalizálnunk. Munkánk során létrehoztunk egy kísérletes mérőrendszert, amely a rovarok szaglásának kísérletes vizsgálatát lehetővé tette. Az antenna elektromos stimulálásával sikerült kiváltott választ detektálnunk az antennális lebenyben. A munka elkezdésekor célul tűztük ki, hogy a rovarok agydúcának anatómiáját az irodalom alapján és saját metszeteinken is megvizsgáljuk. X sáska agydúcából paraffinos metszeteket készítettünk. Több festési eljárást is kipróbáltunk. A legmegfelelőbbnek a Haematoxilin-eosin festés bizonyult, jól elkülöníthetőek az agydúc különböző struktúrái. Cresyl-ibolya festést is használtunk, azonban ennek nem lett olyan szép eredménye, mint a haematoxilin-eosin festésnek, de bizonyos struktúrák jól láthatók.

A dolgozat során tapasztalatokat szereztem egy kutatás elindításának nehézségeiről, a váratlan események áthidalásáról, megismerkedtem festési eljárásokkal és az elektrofiziológiai mérésekről szereztem tapasztalatokat. Munkánk a következő generációnak is hasznára válhat, az állatélettani gyakorlatokon. Illetve leendő szakdolgozatok alapjául is szolgálhat. A munka folytatódhat további rovar fajok vizsgálatával, anatómiai összehasonlító vizsgálatokkal. Különböző kémiai anyagok vizsgálatával, melyek az antennával érintkezve, választ válthatnak ki az antennális lebenyből, vagy a gombatestből.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm a Nyugat Magyarországi Egyetem Savaria Egyetemi Központ Állattani Tanszékének, valamint konzulensemnek Molnár Péternek az izgalmas témát és a segítségét a szakdolgozatom megírásában. A szövettani metszetek elkészítésében nélkülözhetetlen volt Török Tamás technikai tudása.

Köszönöm szüleimnek, hogy lehetőséget adtak a tanulásra.

7 Irodalomjegyzék

- Ache, B. W. és M. J. Young (2005). "Olfaction: diverse species, conserved principles." Neuron 48(3): 417-430
- Anholt, R. R. H. és T. I. Williams (2010). "The soluble proteome of the *Drosophila* antenna." Chem. Senses 35(9): 21-30.
- Aoki, K., K. Kosakai és M. Yoshino (2008). "Monoaminergic modulation of the Na⁺-activated K⁺ channel in Kenyon cells isolated from the mushroom body of the cricket (*Gryllus bimaculatus*) brain." Journal of Neurophysiology 100(3): 1211-1222.
- Benton, R. (2006). "On the ORigin of smell: odorant receptors in insects." Cellular and Molecular Life Sciences 63: 1579-1585.
- Benton, R., S. Sachse, W. S. Michnick és L. B. Vosshall (2006). "Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors in vivo." PLoS BIOLOGY 4(2): 0240-0257.
- Benton, R., K. S. Vannice, C. Gomez-Diaz, B. Leslie és Vosshall (2009). "Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in *Drosophila*." Cell. 136(1): 149–162.
- Cayre, M., S. D. Buckingham, S. Yagodin és D. B. Sattelle (1999). "Cultured insect mushroom Body Neurons express functional receptor for Acetylcholin, GABA, Glutamate, Octopamine, and Dopamine." J Neurophysiol 81: 1-14.
- Cayre, M., S. Scotto-Lomassese, J. Malaterre, C. Strambi és A. Strambi (2007). "Understanding the regulation and function of adult neurogenesis: Contribution from an insect model, the house cricket." Chemical Senses 32(4): 385-395.
- Chatterjee, A., G. Roman és P. E. Hardin (2009). "Go contributes to olfactory reception in *Drosophila melanogaster*." BMC Physiology 9(22): 1-7.
- Dupuy, F., R. Josens, M. Giurfa és J. C. Sandoz (2010). "Calcium imaging in the ant *Camponotus fellah* reveals a conserved odour-similarity space in insects and mammals." BMC Neuroscience 11(28): 1-35.
- Farris, S. M. (2008). "Tritocerebral tract input to the insect mushroom bodies." Arthropod Structure & Development 37(6): 492-503.
- Fonyó, A. és Ligeti E. (2008) Az orvosi élettan könyve, Medicina könyvkiadó zrt., Budapest : 1038-1040
- Ha, T. S. és D. P. Smith (2009). "Odorant and pheromone receptors in insects." Cellular neuroscience 3(10): 1-6.
- Hansson, B. S. (2002). "A bug's smell – research into insect olfaction." TRENDS in Neurosciences 25(5): 270-274.

- Kárpáti, Zs. (2007). Néhány rovar kártevő kémiai kommunikációjának elektrofiziológiai és viselkedési vizsgálata növényvédelmi előrejelzés érdekében. Pannon Egyetem Georgikon Mezőgazdaságtudományi Kar Interdiszciplináris Doktori Iskola. Keszthely.
- Kosakai, K., K. Satoh és M. Yoshino (2008). "Octopaminergic modulation of the single Ca²⁺ channel currents in Kenyon cells isolated from the mushroom body of the cricket brain." Journal of Insect Physiology **54**(12): 1479-1486.
- Kovács, Zs. (2007). Az állattan alapjai (szövegtani gyakorlatok), Balogh és Társa Nyomdaipari, Kiadó és Kereskedelmi Kft, Szombathely: 61-66
- Leal, W. S., Y. Ishida, J. Pelletier, W. Xu, J. Rayo, X. Xu és J. B. Ames (2009). "Olfactory proteins mediating chemical communication in the navel orangeworm Moth, *Amyelois transitella*." PLoS ONE **4**(9): 1-11.
- Lei, H. és N. Vickers (2008). "Central processing of natural odor mixtures in insects." Journal of Chemical Ecology **34**(7): 915-927.
- Lundin, C., L. Käll, S. A. Kreher, K. Kapp, E. L. Sonnhammer, J. R. Carlson, G. v. Heijne és I. Nilsson (2007). "Membrane topology of the *Drosophila* OR83b odorant receptor." FEBS Letters **29**(11): 5601-5604.
- Masse, N. Y., G. C. Turner és G. Jefferis (2009). "Olfactory Information processing in *Drosophila*." Current Biology **19**(16): R700-R713.
- Matsumoto, Y., S. Unoki, H. Aonuma és M. Mizunami (2006). "Critical role of nitric oxide-cGMP cascade in the formation of cAMP-dependent long-term memory." Learning & Memory **13**(1): 35-44.
- Mizunami, M., F. Yokohari és M. Takahata (2004). "Further exploration into the adaptive design of the arthropod "microbrain": I. Sensory and memory-processing systems." Zoological Science **21**(12): 1141-1151.
- Purves, D., G. J. Augustine, D. Fitzpatrick, W. C. Hall, A. S. Lamantia, J. O. Mcnamara és S. M. Williams (2004). Neuroscience. I. P. Sinauer Associates és M. U. S. A. Sunderland. **3**: 337-356.
- Ribeiro Leite, N., R. Krogh, W. Xu, Y. Ishida, J. Lulek, W. S. Leal és G. Oliva (2009). "Structure of an odorant-binding protein from the mosquito *Aedes aegypti* suggests a binding Pocket covered by a pH-sensitive "Lid"." PLoS ONE **4**(11): 1-7.
- Robertson, H. M. és K. W. Wanner (2006). "The chemoreceptor superfamily in the honey bee, *Apis mellifera*: Expansion of the odorant, but not gustatory, receptor family " Genome Research **16**(4): 1395-1403
- Rogers, M. E., M. K. Jani és R. G. Vogt (1999). "An olfactory specific glutathion-s-transferase in the Sphinx Moth *Manduca sexta*." The Journal of Experimental Biology **202**(3): 1625-1637.
- Spehr, M. és S. D. Munger (2009). "Olfactory receptors: G protein-coupled receptors and beyond." Journal of Neurochemistry **109**(6): 1570-1583.
- Széky, P. (1986). Állat az állatnak üzen. Natura, Budapest: 42-101
- Touhara, K. és L. B. Vosshall (2009). "Sensing odorants and pheromones with chemosensory receptors." Annual Review of Physiology **71**: 307-332.
- Vigh, H. B. és Kondics, L. (1997). Összehasonlító szövegtan. Nemzeti tankönyvkiadó, Budapest: 284-289.
- Világi, I. (2003). Neurokémia. Dialog Campus Kadó, Pécs: 177-218

- Vosshall, L. B. (2001). "The molecular logic of olfaction in *Drosophylla*." Chem. Senses **26**: 207–213.
- Wehr, M. S. (1999). Oscillatory sequences of firing in the locust olfactory system: mechanisms and functional significance. California Institute of Technology Pasadena. California.
- Wilson, R. I. és Z. F. Mainen (2006). "Early events in olfactory processing." Annual Review of Neuroscience **29**: 163-201.
- Zboray, G (1998). Összehasonlító anatómiai praktikum. Nemzeti tankönyvkiadó, Budapest: 212-214.
- <http://www.nyf.hu/biologia/sites/www.nyf.hu/biologia/files/Hisztotechnika.pdf> (2010,04,05)
- http://ichworld.com/_protocols/special_stains/nissl-frozen-sec (2010,02,04)