

Nyugat-magyarországi
Egyetem Savaria Egyetemi Központ
Természettudományi Kar
Biológia Intézet

INFORMÁCIÓFELDOLGOZÁS KEZDETI LÉPÉSEI

SÁSKA CSÁPI LEBENYBEN

Konzulens:
Molnár Péter, Ph.D
Egyetemi docens

Nagy Gergő Gábor
BIOLÓGIA

Szombathely, 2012

Célkitűzés

Szakedolgozatom céljával a információfeldolgozás kezdeti lépéseinek reprezentatív vizsgálatát tűztem ki a sáska csápi lebenyében. Ezzel párhuzamosan az erre a területre vonatkozó irodalom és eddigi kutatások bemutatását, valamint saját gyakorlati tapasztalatok gyarapítása. Az erre vonatkozó vizsgálatok középpontjában a glomerulus sejtjeinek elektromos vagy kémiai stimulációval kiváltott válasza állt. A választ extracelluláris, elektrofiziológiai módszerrel történő mérése. Az adatok rögzítése valamint a későbbi elemzése. Különös figyelmet fordítani az oszcillációs mechanizmusok működésére, melyek az információfeldolgozás első lépései.

Bevezetés

Szaglás jelentősége az állatvilágban

A túlélés érdekében a legtöbb élőlény reagál a környezetében észlelhető illatnyomokra. Számos olyan kölcsönhatás létezik állatok és növények, vagy állatok és más állatok között, ahol a kapcsolatot a szaglás biztosítja. Ezeket a kapcsolatokat fel kell derítenünk, ha jobban meg akarjuk érteni környezetünket. Ide tartoznak a növények állatok segítségével történő beporzása, a különböző takarmánynövények által odacsalogatott növényevők, a sebzett növények riasztó hatása vagy a fajon belüli és fajok közötti interakciók is. (Tronson 2001)

A szaglás nagy mértékben befolyásolja a legtöbb lény viselkedését és populációba történő beilleszkedését is. Az éjjeli emlősök életében döntő szerepet játszik a szagok helyes felismerése. Már régóta ismerjük, hogy ez az érzékszerv segít sok állatnak a párválasztásban is. Például A. Petrulis és munkatársai 2003-ban megfigyelték, hogy az aranyhőrcsögöknél létezik egy olyan jelenség, mely során a párzási ösztön ismét felerősödik a nőtények által termelt faj specifikus illatjelek hatására. (Petrulis and Eichenbaum 2003)

Az állatvilágban kifejezetten fontos szerepet tölt be a szaglás. Ez az érzékszerv a környezetben található molekulákra reagál, egy olyan rendszer, mely már a legelső életformákban is jelen volt. Komoly jelentőséggel bír a kommunikációban, egyedek felismerésben és gyakran a hierarchikus szerepek vagy terület felosztásában is. Minden egyed elkülöníthető szagmintával vagy illattal rendelkezik. Már születéstől kezdve, az újszülöttek el tudják különíteni édesanyjukat másoktól mindössze illatok alapján. De ugyanígy, az anyák 24 óra elteltével képesek csecsemőiket szaguk alapján azonosítani. Testvérek is fel tudják ismerni egymást ennek az érzékszervnek a segítségével, valamint a kutyák is képesek különbséget tenni akár ikrek között csak szagok segítségével (igaz, nem egypetéjű ikrek között, mert utóbbi esetben szagmintájuk is azonos). Már több kutatás is rámutatott arra, hogy rágcsálók és emberek esetében is a párválasztási preferencia a különböző illattal rendelkező egyéneket helyezi előnybe, hogy a populáció megőrizze változatosságát. Az illatok a kommunikáció legőszintébb formái, habár sokan már kevésbé vannak ráhangolva a szaglás olyan kifinomult szintjére, amit az állatok még a mai napig birtokolnak. (Reineke 2008)

Szaglás kutatásának fontossága

Mi sem igazolja jobban ennek a szakterületnek a fontosságát, mint az, hogy 2004-ben Richard Axel és Linda Buck Nobel-díjat kaptak a szaglórendszer működésének feltárásáért.

Felfedezték, hogy egy nagyobb géncsalád felelős a szagló receptorokért, valamint azt is ők írták le először, hogy a jeltovábbítás nagyon specifikus: azonos receptorok azonos glomerulusba küldik tovább a jelet.

Modern tudományos módszerekkel már képesek vagyunk megtalálni azokat a kapcsolatokat, melyek a szaglószervek működése és azok élettani hatásuk között rejlik. Ennek eredményeképpen lehetőségünk nyílik akár természetes illatanyagokkal irányítani háziállatok vagy haszonállatok viselkedését. A rovarokkal kapcsolatos felismerések segíthetnek áttörést hozni olyan rovarriasztó szerek kifejlesztésében, melyek nem tartalmazzak az élővilág számára káros anyagokat. A témához szorosan kapcsolódik, hogy több munka született már arra vonatkozóan is, hogy a növények hogyan kommunikálnak egymással – a mechanizmus nagyon hasonló a szaglás folyamatához. (Tronson 2001)

De a szaglás folyamatának részletes feltárása nem csak a mezőgazdasági szerek gyártását illetően segíthet következtetéseket levonni. A szakterületen szerzett ismereteket kivetíthetjük más neurológiai rendszerekre, az anatómiai hasonlóságoknak köszönhetően. Modell rendszerként alkalmazhatjuk, mert a szaglószervi folyamatok feltárásával kapott ismereteket kivetíthetjük más területekre, mint például az agyműködés vagy idegrendszeri zavarok. A szaglás folyamatának megismerése számos terület fejlődését serkentette már. A gyógyszeripar is profitálhat ezekből a kutatásokból. 2009-ben J. Guss és társai kimutatták, hogy legtöbben, akik a Rhinitis nevű gyulladós betegségben szenvednek, allergiás tüneteket is mutatnak. Ezen felül azt a következményt is levonták, hogy amennyiben nem allergiás a Rhinitisben szenvedő páciens, a szaglószervi érzékenysége bizonyos mértékben korlátokba ütközik. (Guss, Doghramji et al. 2009) Arról is szólnak cikkek, hogy a Parkinson vagy Alzheimer kórt a szaglóidegekben végbemenő változások kísérik. A megállapítás hangsúlyozza, hogy az orvosoknak tisztában kell lennie azzal, hogy ezek a tünetek együtt járnak a Parkinson vagy Alzheimer kórral. (Nores, Biacabe et al. 2000) Mindezekon kívül pedig önmagáért is megéri kutatni a szaglórészt. Jobb belátást nyerhetünk a neurológia egy fontos területére, hiszen ez lehetne az első teljesen feltérképezett és kiismert mechanizmus az idegrendszerben, melyről még mindig oly keveset tudunk.

Szaglás evolúciója

Az emlősök és rovarok szaglórendszere egy kitűnő példa a konvergens evolúcióra. Mindkét rendszer egymástól függetlenül fejlődött ki, mely arra utal, hogy a szaglási információ feldolgozásának létezik egy hatékony, konzervatív módja. Az átmeneti fajok közötti különbségek a funkcionális vagy szerkezeti szintekben térnek csak el (Kay and Stopfer 2006).

Csak a fejlettebb, metazoák esetében beszélhetünk szaglószervről. A törzsfajlásban alacsonyabb rendű élőlények még nem rendelkeznek valódi szövetekkel, melyek szerveket alkotnának (egysejtűek, szivacsok). Az egysejtűek elsősorban a membránjukba épült receptor fehérjék segítségével érzékelnek és kémiai közvetítést használnak. A törzsfajlás létra legalsó fokán álló, többsejtű fajok nitrogénoxid segítségével indukálják az illatok feldolgozásának folyamatát. A nitrogénoxid (NO) folyamatokra más gerinctelen és gerinces csoportokban is találhatunk példát. Azt is megfigyelhetjük, hogy milyen módon képesek helyettesíteni a NO szerepét más molekulák segítségével. Ezek mind érzékszervekben, elsősorban a szaglórendszerben jelennek meg. Az alsóbbrendű metazoák NO szignál rendszere egy alternatív evolúciós út, mely párhuzamosan fejlődött ki a fejlettebb NO rendszerrel rendelkező állatok elődjével. Ugyanakkor egyre több bizonyíték utal arra, hogy a NO volt a legkorábbi és legelterjedtebb jelzőmolekula. Már sikerült leírni azt a rendszert, mely áthidalja azt az evolúciós szakadékot, ami korábban mutatkozott a protozoák és magasabb rendű metazoák között. (Colasanti, Persichini et al. 2010)

Primitív rendszerek

A csalánozók szaglószervéről nagyon kevés tanulmány készült. Ennek oka abban rejlik, hogy idegrendszerük nagyon kezdetleges és nem rendelkeznek központi idegrendszerrel sem. A neuronjaik egy hálózatot alkotnak, melyek néhány helyen gangliákat alkotnak. Ezek kisebb központokként szolgálnak. A csalánozók egy része képes mozgásra és reagálnak illatokra. Az illatok feldolgozásának pontos folyamatát egy olasz kutatócsoport írta le és publikálta a Neuroscience magazinban, 1997-ben. (Colasanti, Venturini et al. 1997) Állításuk szerint a hidrák táplálkozási válasza nem más, mint egy nagyon primitív szaglószervre emlékeztető viselkedés, mely egy többsejtű egységben van jelen. A megfigyelések szerint a nitrogénoxid (NO) játszik szerepet a hidra táplálkozásának lebonyolításában. A tanulmány jól mutatja, hogy a hidrák nagyon egyszerű táplálkozási mechanizmusa egy ősi szaglószervvel áll összeköttetésben.

A tüskésbőrűek esetében is NO alapú ingerület átvitelről van szó, azonban itt már megjelennek más neurotranszmitterek is. Egyes tengerisün fajokról (*Colobocentrotus atratus*) feltételezik, hogy az utószáji kitekert lebeny működése összefüggésbe hozható azokkal az érzékelő neuronokkal, melyek telepképzés során aktiválódnak. Ezek szaglószeri idegsejtek és komoly átalakuláson mennek keresztül a lárvaállapot során. (Bishop and Hall 2009)

A génvizsgálatok rámutattak arra a tényre, hogy a tengeri sünök genomjának több mint 3%-a csak G-proteinek kódol. Ezen belül, rodopszin típusú G-fehérjéhez kapcsolt receptorok, melyek komoly szerepet játszanak az állat érzékelésében. Kémiai receptoroknak tartják, melyek specifikusan jellemzőek egyes echinoid nemzetségekre. Azt is megfigyelték, hogy a tengerisünöknek nagyon összetett opszin rendszerrel rendelkeznek, melyek differenciáltan ismerik fel a környezetükben található molekulákat. (Raible, Tessmar-Raible et al. 2006)

A filogenetikai szinten különböző lépcsőfokon álló állatok idegrendszere és idegrendszerük alkotórészei egyre fejlettebbek, ahogy felfelé haladunk az evolúciós létrán. A gyűrűsféreg az ízeltlábúak legközelebbi rokonainak tekinthetőek, mivel szelvényezettségük és idegrendszerük nagy hasonlóságot mutat. A földigiliszták szaglószerjében található sorozatok egyértelműen abban segítik, hogy eljusson a gombákhoz, vagy azokhoz a mikroorganizmusokhoz, melyek táplálékul szolgálnak számára. A giliszták szaglása rendkívül kifinomult és összetett módon kutatnak a táplálékforrások után. Már azokat a specifikus receptorokat is sikerült azonosítani, melyek ebben a folyamatban részt vesznek. A legfontosabb stimuláló hatást számukra az etil-pentanát és az etil-hexanát jelenti. (Tabata, De Moraes et al. 2011)

A tanulás megjelenése

A szárazföldi meztelen csigák már rendelkeznek a képességgel is, hogy megtanuljanak szagokat. Fluoroescencia méréssel sikerült kimutatni, hogy a csigák étvágygerjesztő és irtózást előidéző kondicionálás után másképpen viselkedtek az adott szagminta hatására. Ez egyértelműen mutatja, hogy nem az illatanyagban, hanem az azzal összekapcsolt információban bíztak jobban. Számítógépes szimulációval arra is sikerült fényt deríteni, hogy ez a folyamat az idegrendszer szaglóközpontjának különböző rétegeiben bekövetkezett oszcilláció változásnak köszönhető. (Sekiguchi, Furudate et al. 2010)

A csigák azonban nem ugyanazzal az érzékenységgel figyelnek a szagokra állandóan. Egy másik kísérlet bebizonyította, hogy – akárcsak a gerincesek esetében – a receptorok aktivitása

a levegő mozgásával összefüggésben van. Gerinceseknél a légzéssel és szimatolás intenzitásával párhuzamosan növekszik a neuronok ingerlékenysége is. Ugyanezt a folyamatot a csigáknál is sikerült már kimutatni. Extracelluláris mérésekkel kimutatták, hogy a szagló epiteliomok és csápi idegek – melyek másodlagos szaglószeri központok – aktivitása megnőtt a levegő mozgásának hatására, függetlenül a jelenlévő illatmolekulától. Ezt a jelenséget izolált receptor preparátumokon is sikerült bizonyítani (Ito and Schuman 2008).

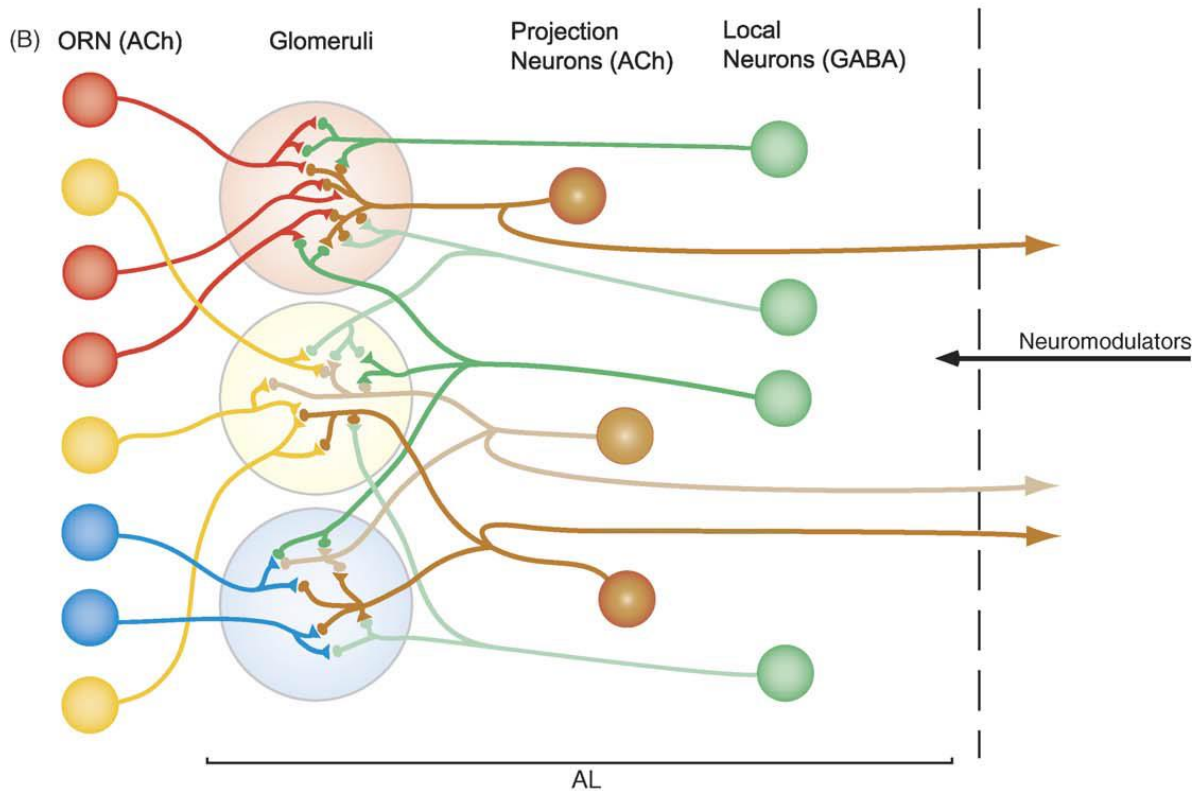
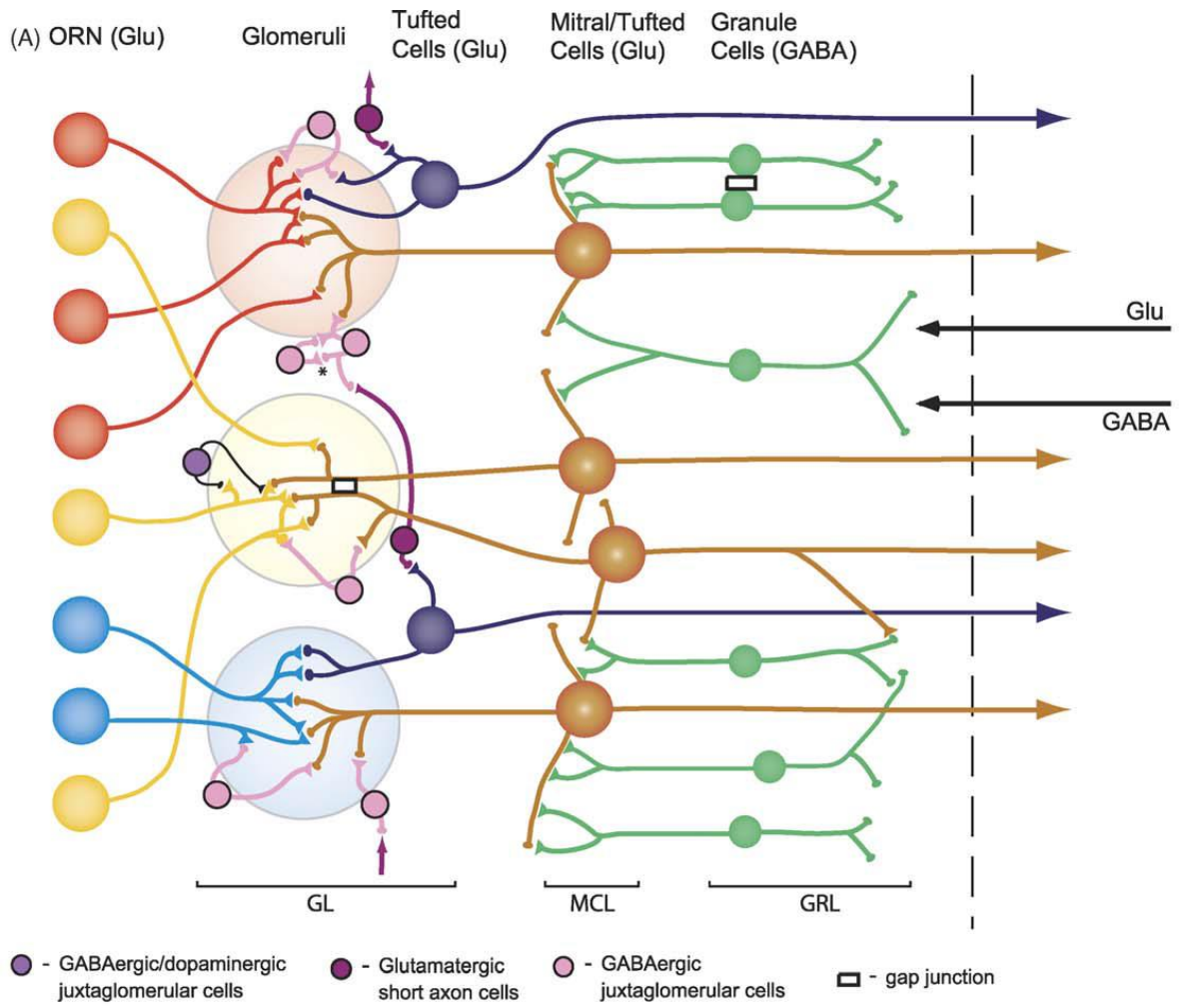
Gerincesek

A szaglórendszer szinte minden gerinces esetében rendkívül hasonlóan épül fel. A központi szaglóiidegek filogenetikai elemzése azt az eredményt hozta, hogy legalább három eltérő alrendszer létezik a ma is élő gerincesek között. Ezekon kívül van még egy negyedik, vomeronasal rendszer is, mely a négy lábúak között terjedt el. Ez utóbbi nem a szárazföldi alkalmazkodást segítette (ahogy korábban hitték), mert a vomeronasal szerv jelen van több modern vízi kételtűben és ősi tojásrakókban is (Eisthen 1997). Más elméletek is napvilágot láttak, melyek többek között azt elemzik, hogy létezik-e egy általános rendszer, mely a vízben és levegőben oldott molekulákat egyaránt képes érzékelni. Jelenleg nincs bizonyíték arra, hogy egyetlen komplex egység végezné ezeket a funkciókat, ahogyan arra sincs, hogy az általános szagminták és feromonok érzékelése köthető lenne egyetlen mechanizmushoz.

Több tanulmány is foglalkozott már az emlősöknél tapasztalható oszcillációs mechanizmusok tulajdonságaival. Ezek gyors, avagy „gamma” rezgések, melyek macskákon, patkányokon és egereken végzett kísérletek alapján kerültek rögzítésre. Fajtól függően, ez a gamma oszcilláció körülbelül 40-75 Hz közé esik, szemben a zebrahalnál tapasztalt gamma-szerű rezgésnél, mely a rovarok frekvenciájához közelebb áll (20-30Hz). (Kay and Stopfer 2006)

Anatómia

A szaglórendszer egy konzervatív mechanizmus, mely gerincesben és rovarokban nagyon hasonló felépítéssel rendelkezik (Kay and Stopfer 2006). Ezzel szemben a szerv - mely ellátja a szaglás feladatát – nagy morfológiai változatosságot mutat. Jól nyomon követhető, hogyan fejlődött együtt az idegrendszerrel és milyen evolúciós változásokon ment át. A csalánozók dúcidegrendszerében egy nagyon primitív Nitrogén-oxidon alapuló rendszer segít a táplálék felismerésében, ezzel szemben a rovarok már sokkal összetettebb neuronhálózattal és specifikus szervekkel rendelkeznek már.



Felül: a gerincesek, alatta: a rovarok szaglórendszerének felépítése.

Forrás: (Kay and Stopfer 2006)

A gerincesek és rovarok szaglórendszerének szerkezete rendkívül sok hasonlóságot mutat.

(A) Szaglóhagyma és neuronhálózata. Az azonos szagmintát jelző neuronok azonos glomerulusba futnak, ahonnan a jel sokféle különböző sejtbe futhat tovább.

(B) Egy *ecetmuslica* csápi lebenyének struktúrája és a hozzá kapcsolt idegek rajza. A szaglóidegek a csápban és a szaglórendszerhez kapcsolva találhatóak. Akárcsak gerincesekben, itt az egyféle szagmintát bemutató receptorok neuronjai azonos glomerulusba torkollanak.

Receptor

Az összetett illatminták gyakran eltérő érzékelhető tulajdonságokkal rendelkeznek, mint amit összetevői önmagában hordoznak. Az embereken, rágcsálókön és rovarokon végzett korábbi kísérletek már kimutatták, hogy komplex szagminták érzékelése nagyban függ a koncentrációtól és a az alkotók összetettségétől. Arról azonban viszonylag keveset tudunk, ahogy a szaglórendszer létrehozza a komplex vegyületekhez tartozó mintázatot. (Choudhary, Laycock et al. 2012)

A szaglóreceptorok – annak ellenére, hogy az összes ugyanabból a hét transzmembrán doménnal rendelkező G-fehérjéből épül fel - nagyon kevés más közös jellemzővel rendelkeznek. A mai napig, mindössze a *Drosophila melanogaster* az egyetlen faj, melynél teljes körűen megtörtént a mintázati kifejeződés felépítésétől a funkcionális vizsgálatokig. Ezek a vizsgálatok nagyon sok korábban gerinceseken végzett megfigyelést alá támasztottak. Az egyik ilyen, hogy egy szagló receptor altípusokra osztott módon kapcsolódik a kapcsoló idegsejthez és egyetlen neuron csak azonos típusba tartozó receptorokhoz kapcsolódhat.

(Harini and Sowdhamini 2012)

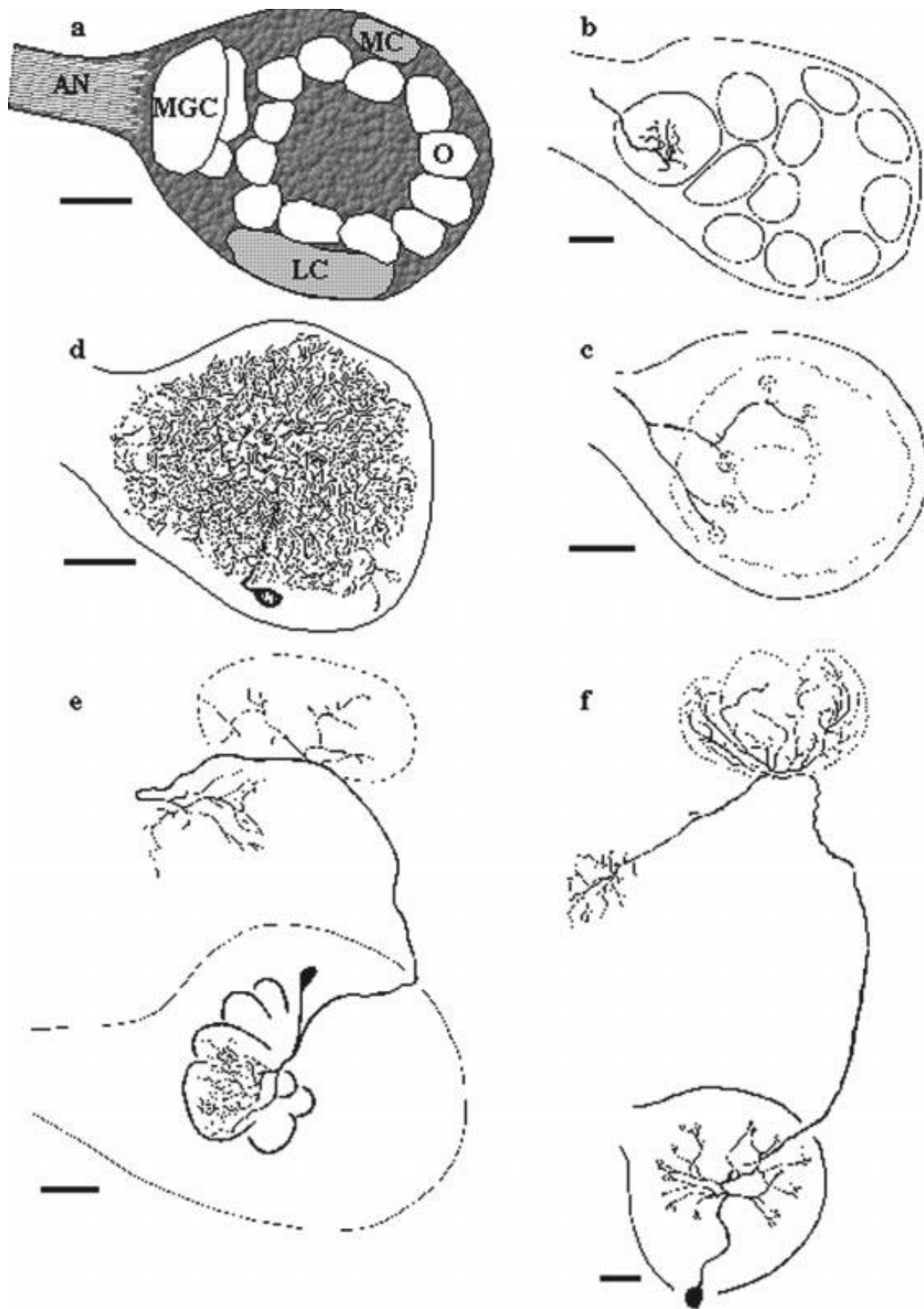
Glomerulus

Rovarokban és gerinceseknél egyaránt a szaglószeri neuronok az agy specifikus régióiba küldik a serkentő jeleket. Ezt a funkciót a rovaroknál a csápi lebeny, gerincesek esetében a szagló hagyma (Olfactory Bulb) tölti be. Az itt található glomerulusokat idegzik be azok a kolinerg (gerincesek esetében glutamáterg) axonok, melyek a csápi lebenyből és az orr epitheliумаiból indulnak. A térben elszórt receptorok jelei összeadódnak, így biztosítva van bőségesen a mintavételnek kitett receptorok száma, ezzel csökkentve a zajszintet az adott illatkonzentrátumban. (Hansson and Anton 2000)

Csápi lebeny

A rovarok csápi lebenye (Antennal Lobe) egy gömb alakú szerv, mely része a deutocerebrumnak. Az ide tartozó neuronok a szagló receptorokhoz kapcsolódnak, melyek a csápon és a szájban találhatóak. Az anatómiai felépítése nagyon hasonló más állatok szaglóközpontjához. A csápi lebenyben megtalálható glomerulusok száma fajtól függ, ahogyan az is, hogy hány glomerulusok közötti kapcsoló neuron található. A glomerulusok száma a 32-től (a szúnyogban) akár több mint 1000-ig (sáska és társas darazsak) változhat. A legtöbb rovar esetében a csápi lebeny 40-60 darab különálló glomerulust tartalmaz egy vagy két rétegben elhelyezkedve a központi rostos mag körül. A sáskák és társas darazsak esetében léteznek még kis glomerulusok, melyek a központi magot közvetlenül övezik. Ezek azonban nem egyenként elkülönülő glomerulusok. A glomerulusok egymástól gliasejtekkel vannak elválasztva teljesen vagy csak részlegesen. Több fajnál is felfedezték, hogy a különböző nemű egyedek más glomerulális felépítéssel rendelkeznek. Ennek oka a feromonokban keresendő.

(Hansson and Anton 2000)



A csápi lebeny sematikus rajza. Forrás: (Hansson and Anton 2000)

- a) A csápi ideg bal-felső irányból lép be. A csápi lebenyben glomerulális szerv egy egyszerű glomerulussal és makroglomerális komplexummal (MGC) van ábrázolva. Az MGC csak a feromonokat felvevő nemnél van jelen (általában hímnél).
- b) Szaglóiideg elágazások egy hím *Spodoptera littoralis* csápi lebenyében.
- c) Multiglomerulális elágazások egy *Schistocerca gregaria*.
- d) Ágszerű elrendeződés a helyi kapcsolóneuronok között egy nőstény *Spodoptera littoralis* példányban.

Szaglás folyamata

A rovarok és emlősök külön úton fejlesztették ki szaglószerveiket, mégis azok meglepően hasonlóan működnek. A filogenetikai elemzések kimutatták, hogyan fejlődött a környezet és életmód hatására a szaglószer (Hansson and Stensmyr 2011) valamint, hogy a különböző csoportok esetében is konvergens fejlődést mutat a szagok feldolgozásának rendszere.

Muslicáknál megfigyelték, hogy a szagló receptorok hét transzmembrán szegmensből állnak és fordított membránfelépítéssel rendelkeznek, mint a klasszikus G-proteinhez kapcsolt receptorok. Kiderült az is, hogy a rovar-illatokért felelős receptorok ioncsatornáit a receptorokhoz vannak csatolva. A feromonok érzékelése még egy ennél is furcsább rendszerbe, mert olyan sejten kívüli, oldható receptorokat hasznosít, melyek konformáció változásokon mennek keresztül (Ha and Smith 2009).

A folyamat során a rovarok esetében csápok (antenna) töltik be a szag ingerének felvételét és továbbítását. A szagló receptorok felépítése egy összetett fehérjével párosított érzékszerv, mely képes detektálni bármely 300 Daltonnál könnyebb, illékony, hidrofób molekulát (Wilson and Mainen 2006). Az illatok nagyszámú receptorokon keresztül kerülnek felvételre, majd a glomerulusba továbbítódik a jel, ahol később csoportosításra kerül. A glomerulus specifikus és több irányban is kapcsolt neuronokat tartalmaz, melyek együttes vagy külön történő ingerlése más-más hatást eredményez (Kay and Stopfer 2006). A sáska esetében a csápi lebenyben található közvetítő idegsejtek (Projectile Neurons, PN) depolarizációval és hiperpolarizációval reagálnak a szaglóingerre. Ezek mindegyike eltart akár több száz milliszekundumig is. Számítógépes modellezés (Bazhenov, Stopfer et al. 2001) azt is kimutatta, hogy a csápi lebenyben zajló lassú, gátló kapcsolatok felelősek az ideiglenes mintázatok kialakulásáért. Bebizonyosodott az is, hogy gyors és lassú gátló mechanizmusok is képesek dinamikusan átrendezni a helyi és közvetítő neuronok kapcsolatát, mely nem csak a rovaroknál, de gerincesek esetében is igaz.

Mesterséges orr

A biológia már számtalan esetben inspirálta a mérnöki munkát. Ide tartozik a kémiai érzékelés is. A modern megközelítések segítségével, biológiai ismeretekre alapozva létrehoztak egy olyan szerkezetet, mely ötvözi a kiválasztó kémiai érzékelőket egy mintázatfelismerő rendszerrel. Az eszköz képes szagok felismerésére és elkülönítésére. (Raman, Stopfer et al. 2011)

A spontán idegi aktivitás és a szinaptikus zaj nem ismeretlen fogalmak, de biológiai jelentőségüket még csak kevesen vizsgálták. H. Liljenstrom és munkatársai 1995-ben egy számítógépes modell segítségével bebizonyították, hogy a szaglókéregben jelenlévő időleges zaj csökkentheti az asszociációs memória előhívási idejét. Megfigyelték mind az összeadódó és sorozatos zajok hatását, valamint sikeresen megtalálták azt a zaj szintet, ahol a legrövidebb az előhívási idő. Bizonyítást nyert, hogy a zajszint döntő szerepet játszik a rendszer hangolásában. Megváltoztatásával drasztikus változások tapasztalhatóak, kellő növelésével pedig kaotikus viselkedést lehet előidézni. (Liljenstrom and Wu 1995)

Információfeldolgozás

A szaglószerző információfeldolgozásának leírására már sok munka született, ami annak köszönhető, hogy egyszerű vizsgálni és preparálni a szervet. A receptorokból érkező ingerek feldolgozása már a glomerulusban megkezdődik. Sáskák esetében ez a csápi lebenyben helyezkedik el, mely több glomerulust is tartalmaz. Minden glomerulus nagy számú szagló receptor neuronból kap bemenetet. Glomerulus elhelyezkedése eltér a gerincesek és rovarok szaglószerzőjében. Gerinceseknél a folyamat lineáris: a receptorból vezető neuron mindössze egyetlen szagló hagymán vezet keresztül mielőtt elérne egy érzelmi, vagy kognitív központot. A rovaroknál azonban elágazás tapasztalható. Itt az érzet a csápi lebenyben két irányba mehet tovább: vagy a gombatest felé veszi az irányt vagy a laterális protocerebrumba. Bár a csápi lebeny nem rendelkezik azzal kétlépcsős rendszerrel mely a szinaptikus inhibícióért felelős a gerinceseknél, mégis sok hasonlóság van a két szervben (Yaksi, Judkewitz et al. 2007). A gerincesek esetében a szaglórésznek meg kell küzdenie azzal a problémával, hogy pontosan hogyan kössön össze több millió neuront, melyek különböző receptorokból érkeznek és az agy különböző pontjait veszik célba. Az újabb tanulmányok azt mutatják, hogy a rendszer rendkívül rugalmas módon integrálja az új információt és hatékonyan továbbítja az ingerületet (Vosshall 2003).

A csápi lebenyben ideiglenes párhuzamos szinkronizálás is tapasztalható a befutófutó idegek között. Egy számítógépes (Hodgkin-Huxley típusú) modell alapján feltételezhető, hogy a csápi neuronok és a továbbító neuronok között egy összefüggő oszcillációs hálózat alakul ki a szag stimuláció során. A helyi neuronok közötti GABAnerg kapcsolatok egymással versengésben vannak. Ennek hatására különböző Ca^{2+} csúcsok jelennek meg, ezek 50-250 ms hosszúak. A jelenség nagyon hasonló az élő sejteken végzett kísérletekhez. A modell jól

mutatja, hogy a gátló rendszerek hogyan váltják egymást valamint, hogy ideiglenesen képesek kódolni az érzékszervek információját (Bazhenov, Stopfer et al. 2001).

A gerincesek információfeldolgozására vonatkozóan a korábbiakkal szembenálló elmélet látott napvilágot 2008-ban. Wilson és kollégái felvázolták, hogy in vivo és in vitro kutatásaik alapján nem egy laterálisan kapcsolt, rendezett gátlórendszerrel van szó, hanem elszórt, rendezetlen és ingerlékeny. Ezen kívül a legtöbb állat tudatosan is képes befolyásolni a levegő áramlását a szagló receptorokon. A szárazföldi gerincesek ezt a szimatolás folyamatával érik el, a rovarok csápjukat mozgatják, kígyók pedig a nyelvük kiöltésével végzik ezt. A rovarok szárnyuk evezésével, vagy a levegőben terjedő illatfolyamban előre-hátra repülve is képesek a mintavételezésre (Wilson 2008). Az információfeldolgozás megfigyelése során tehát sokkal több körülményt kell figyelembe vennünk, mint ahogy azt korábban hitték.

Az információ kódolásának egyik legfontosabb egysége az oszcillációs mechanizmusban van, mely a membránon keresztül vitt inger rezgéséből ered. Erről a jelenségről ismeretes, hogy a tanulásban, rendszerezésben és információfeldolgozásban játszik szerepet, azonban felvetül a kérdés, hogy konkrétan mi is a feladata az oszcillációs mechanizmusnak a szagminták felismerésében? Válaszként három lehetséges, központi feladatot vizsgáltak – melyek feltétlenül nem zárják ki egymást. Az első felvetés az, hogy óráként funkcionál: az időt határozza meg tetszőleges egységekben. Majd a csápi lebenyben az oszcillációs sorozatokhoz hozzárendelés következik egy-egy időtartományhoz. Ebben az esetben minden ilyen egység egy szinkronban kisülő felettes idegsejt alcsoportot jelent. A második, ehhez kapcsolt funkció az, hogy az oszcillációs folyamatok mellett egy ritmikus gátlásnak is végbe kell mennie, amitől az szagminták bemutatása elszórttá válik. A harmadik lehetséges feladata az oszcillációs szinkronizálásnak az, hogy szabályozza a különböző időtartamú szagminták prezentációját. (Kay and Stopfer 2006).

Tanulás

A szaglás vizsgálatán keresztül lehetőség nyílik betekinteni a tanulás folyamatába is. Miközben nyomon követjük a kiváltott ingerületeket, láthatjuk, hogy mely területek aktiválódnak és milyen sorrendben. Az érintett neuronok mind meghatározott funkciót látnak el, ezért pontos ismereteket szerezhetünk működésükről. Megfigyelhetjük az érzet, visszacsatolás és jutalmazás rendszerét. Már bebizonyosodott, hogy akár rovarokat is lehet rendkívül gyorsan szagokra tanítani (Yakihisa Matsumoto, 2000). Egy kísérlet során például sikerült kondicionálni tücsköknél, hogy a borsmenta illatát azonosítsák a vízzel és NaCl

oldatot a vanília illattal. Már egy egyszeri szoktatás során a tücskök inkább a – korábban kevésbé preferált – borsmentát választották. Ugyanakkor a vizsgálatok azt is kimutatták, hogy később felülírható a korábban tanított kapcsolat. A szaglómemóriáért felelős régiót az ízeltlábúakban a gombatesthez kötjük (Finelli, Haney et al. 2008). A gombatesten végzett kísérletekből kiderült, hogy a Kenyon-sejtek specifikus válasszal rendelkeznek minden illatra, azonban ugyanarra a szagra a válasz gyakran más sejteket érint mint korábban. A csápi lebenyben és a gombatestben is elszórtan, látszólag rendszertelenül helyezkednek el a szinapszisok.

Több cikk is foglalkozott már azzal, hogy a hosszútávú információkódolásban és tanulásban az oszcillációs jelenség meghatározó. Csak egy példát említve: a patkány szaglólagymájában béta-oszcillációkat figyeltek meg, melyet specifikus szagmintákkal váltottak ki és összefüggésbe hozható az elvárési és tanulási folyamatokkal. (Kay and Stopfer 2006)

A legtöbb állat a szenzoros ingerekre különböző agyterületen lezajló idegi összerendeződésekkel válaszol. A szaglórendszer esetében az illatok által kiváltott csápi lebenyben bekövetkező oszcillációs szinkronizálódás az, amit a lassabb és inger specifikus ideiglenes aktivitás mintázatok kiváltanak. Ebből adódóan, minden egyes szagminta más és más átkötő idegsejt csoportot aktivál. A kiteljesedés folyamata a stimuláció során kötött az oszcillációs órához. A csoportok válaszána intenzitása gyorsan csökken, ugyanakkor a neuronok közötti koherencia és tüzelési-idő pontossága növekedik. Amikor felállt ez a nagy precízitással rendelkező állapot, percekig fenn is maradt. A változás stimulálás-specifikus és a csápi lebeny eseményeitől függ, a szagló receptorok adaptációja nem befolyásolja. Ez a haladó változás a szaglórendszerben az összetartást erősíti és ismételt mintavételezés esetében ez egy precízebb és besorolásra jobban készen álló bemutatást tesz lehetővé. (Stopfer and Laurent 1999)

A viselkedésbeli teljesítmény és a sejtek fiziológiája az ideghálózatban bekövetkező változásokhoz vezet, mely az emlősök esetében a hosszú távú memória működését támogatja. Patkányokat kondicionáltak egy kísérlet során arra, hogy asszociatív megkülönböztetéseket végezzenek szagminták alapján. A természetes szagmintákat hasonló ingerekkel helyettesítették. A szagminták tanulása olyan szinaptikus változásokat eredményezett melyek megfigyelhetőek voltak a szagokkal kapcsolatos alapvető viselkedési formákban. Korai szakaszban a fogazott gyrusban a monoszinaptikus hatékonyság emelkedett első alkalommal, majd később, mikor a patkányok elkezdtek meglátni az összefüggést a szagok és jutalmak között, akkor egy poliszinaptikus elváltozást lehetett tapasztalni a hippocampus rendszerén.

Így, csak akkor jelent meg komolyabb szinaptikus változás, amikor a patkányok levonták a következtetést. Ezek a változások reagálhatnak az illat-jutalom összefüggés hosszú távú elraktározódásra a kéregállományban. {Roman, 2004 #3864}

Vizsgálati módszerek

Mivel a szaglószervek működése egy széles körben kutatott téma, ezért rengeteg módszer közül tudunk választani. Jól ismert, hogy a csápi lebenyben lezajló információ átadásának több jele is van, melyet képesek lehetünk mérni. Egyik ezen módszerek közül a Ca-ionos képalkotás. Ez egy fotokémiai módszer, mely két dimenziós képet ad az ingerület által bejárt útról.

Egy másik megoldás az elektromos jelek felvétele egy extracelluláris erősítő segítségével. Ebben az esetben mindössze egy ponton tudjuk vizsgálni az ingerület jelenlétét, azonban előnye, hogy számítógépes elemzés mellett kvantitatív eredményeket kapunk a membránpotenciál változásairól.

Módszerek

Alábbiakban azok a berendezések és eljárások leírása következik, mellyel a szakdolgozat során végeztük a vizsgálatokat. A rendelkezésre álló eszközök és anyagi korlátok miatt több eszközt saját kezűleg kellett előállítanunk, hogy munkánkat segítse.

Sáskák tartása

A mintául szolgáló sáskákat egy jól szellőző terráriumban voltak tartva a tanszéken egy ablakhoz közeli helyen. Egyszerre több példány is helyet kapott ebben a tározóban, miközben minden nap friss növényi táplálékkal és folyadékkal látták el a tanszék munkatársai őket.

Eszközök

Ebben a kísérletsorozatban extracelluláris elektrofiziológiás méréseket végeztünk, melyek során azt mértük, hogy a csáp ingerlésekor milyen elektromos jeleket tapasztalunk a glomerulusban. Ehhez fel nyitottuk a fej frontális oldalán található pajzsot. A csápi lebeny felszínéhez érintett hegyezett wolfram elektródok segítségével végeztük a mérést. Az adatok feldolgozására egy CED 1401 analóg-digitál jelfordítót, F3 erősítőt és egy asztali számítógépen futó SPIKE2 nevű programot használtunk. Az ingerület kiváltásához GRASS XXX elektromos stimulátort alkalmaztunk.



GRASS Elektromos stimuláló

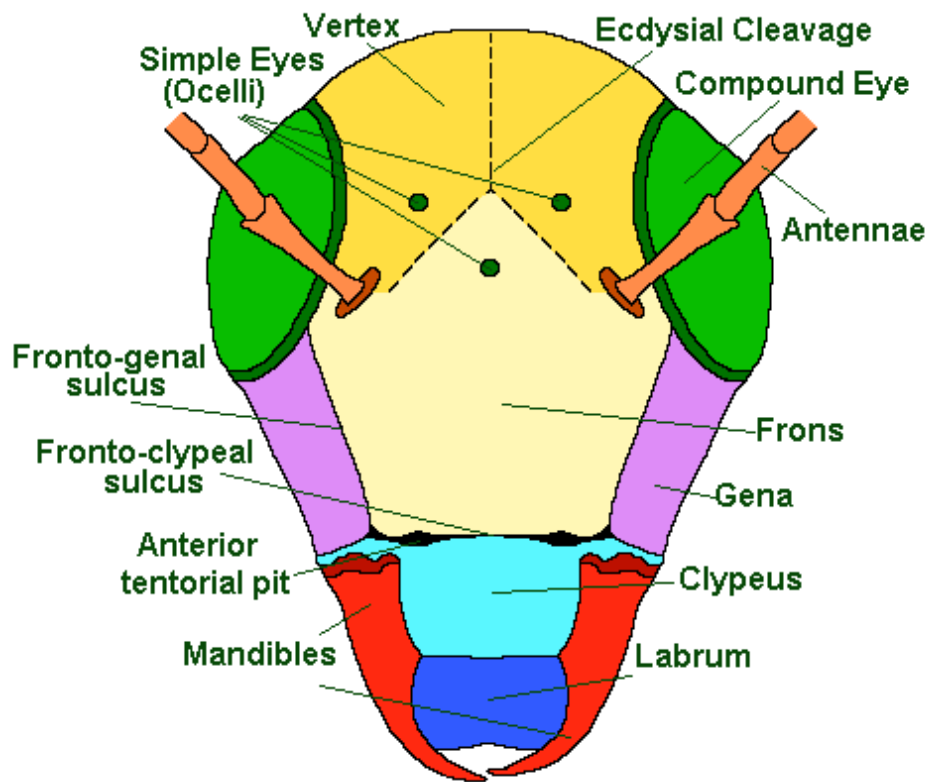


CED 1401 analóg-digitál jelfordító

Disszekció

A sáska preparálását egy sztereomikroszkóp alatt végeztük el. Először a fejet rögzítettük – a későbbiekben földelést szolgáló – tűkkel. Egy könnyen formálható gyurma segítségével a mérni kívánt csápot olyan pozícióba szorítottuk, hogy az ne tudjon megsérülni vagy elmozdulni. A preparáció során felnyitottuk a sáska fejtokjának elülső részét. A homlok pajzsot (frons) a fronto-genal sulcus mentén választottuk le a pofától (gena) és a fronto-clypeal sulcus vonalán haladva vágtuk el a clypea-tól. A csáp környékén óvatosan haladtunk körbe, hogy a csápi lebeny és idegrostok ne sérüljenek.

The Insect Head (Frontal)



Rovar fej anatómiai felosztása.

Forrás: <http://www.entomology.umn.edu/cues/4015/morpology/>

A kiválasztott mintaállatnak nagy előnye volt a méretén túl az is, hogy a felnyitott kutikula alatt jól elkülöníthető volt a zsírszövet a csápi lebenytől és az agydúc többi részétől.

A preparáció során szem előtt kellett tartanunk, hogy a sáska életfunkciói idővel lecsökkennek és a túl hosszú boncolás akár használhatatlanná is teheti a szerveket. Általában a haláltól számítva 10-15 perc alatt sikerült mindig befejezni az előkészítést és megkezdeni a mérést.



Sáskafej felnyitva. A két csáp között hozzáférhetővé vált a glomerulus. A preparált fejen jól felismerhető az agydúc sötétebb képlete és a pajzs alatti zsírréteg világosabb tömege.

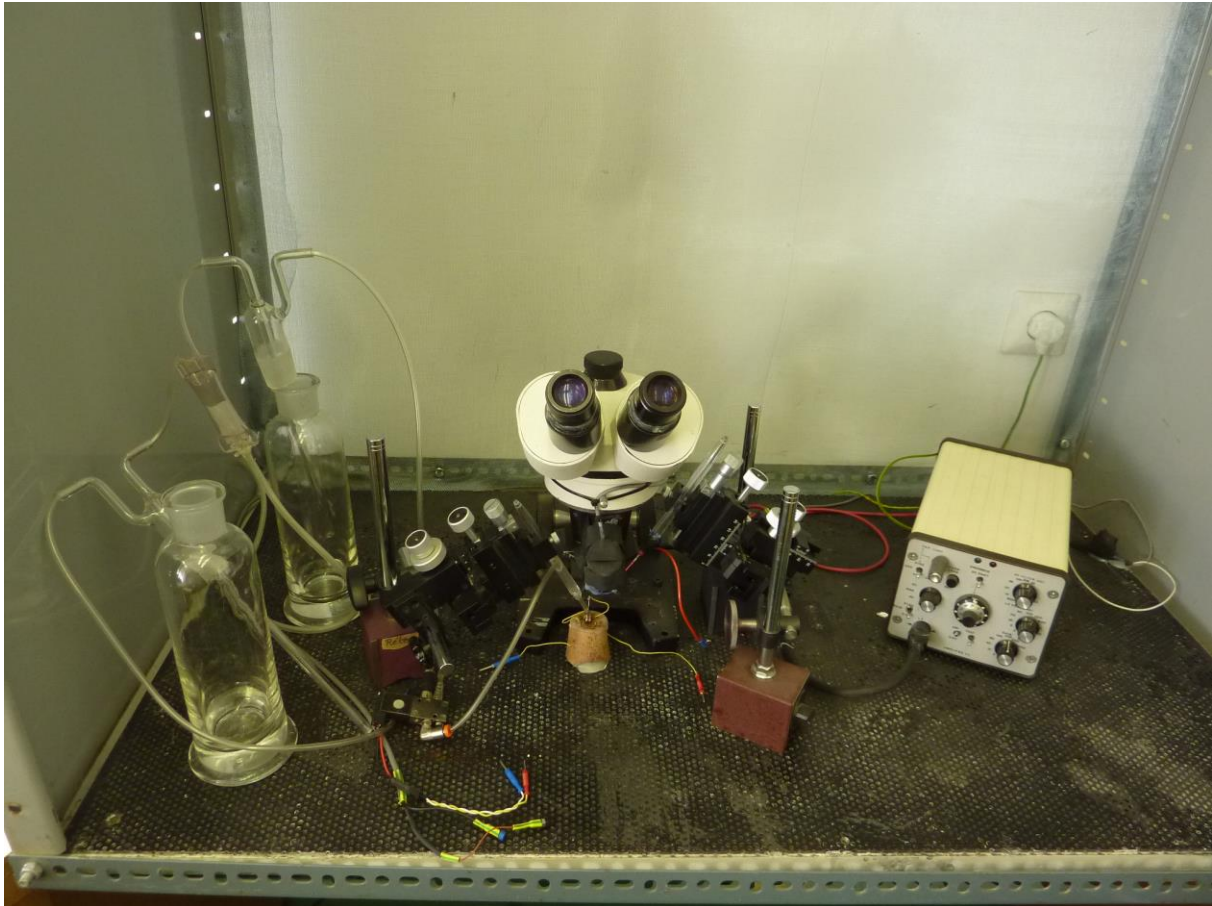
Miután felnyitottuk a fejet, láthatóvá vált a garat felett a deutero-cerebrum és a glomerulus. Néhány alkalommal további tisztításra volt szükség, hogy az egyes szerveket jól el lehessen különíteni a kitin pajzs alatti zsír és kötőszöveti rétegektől. Ebben a stádiumban rovar ringer hozzáadásával tartottuk a sejteket élettani állapotukban. A rovar ringer egy fiziológias oldat, mely a következő összetétellel rendelkezik: 10,93g NaCl ; 1,57g KCl; 0,83g CaCl₂*2H₂O; 0,83g MgCl₂*6H₂O 1 liter deszt. vízben

Előkészítés a méréshez

A csápot bevezettük egy műanyag csőbe, mely rovar ringert és egy elektródát tartalmazott. Ez az elektróda a stimulátorra volt rákötve. Ehhez egy Grass S48 típusú stimulátor állt rendelkezésünkre, melyen beállítottuk az impulzusok erősségét, időtartamát és ütemét.

Az alapra rögzített fejet áthelyeztük a mérőkamrába. A mérő elektródát MM33 típusú mechanikus 3D manipulátorral a glomerulus felszínéhez pozícionáltuk. Az elektróda hegyét a glomerulus felszínéhez érintettük, mivel a membránon bekövetkező feszültségváltozás ezen a felületen már érzékelhető. A mérő elektróda földelését az egyik rögzítő tű adta.

A mérés megkezdése előtt zajszűrést és optimalizálást folytattunk. A zajszennyezés nagyban befolyásolhatja a mérések eredményét, ezért a lehetőségekhez mérten igyekeztünk kizárni minden lehetséges zajforrást, hogy tiszta és egyértelmű jeleket kapjunk. Ezt a gépek megfelelő pozícionálásával, földelésével és elektromágneses árnyékolásával tudtuk elérni. A mérést csak azután kezdhettük el, amikor már a zajszintet olyan mértékben lecsökkentettük, hogy az nem keltett szignifikáns zavart a jelben.



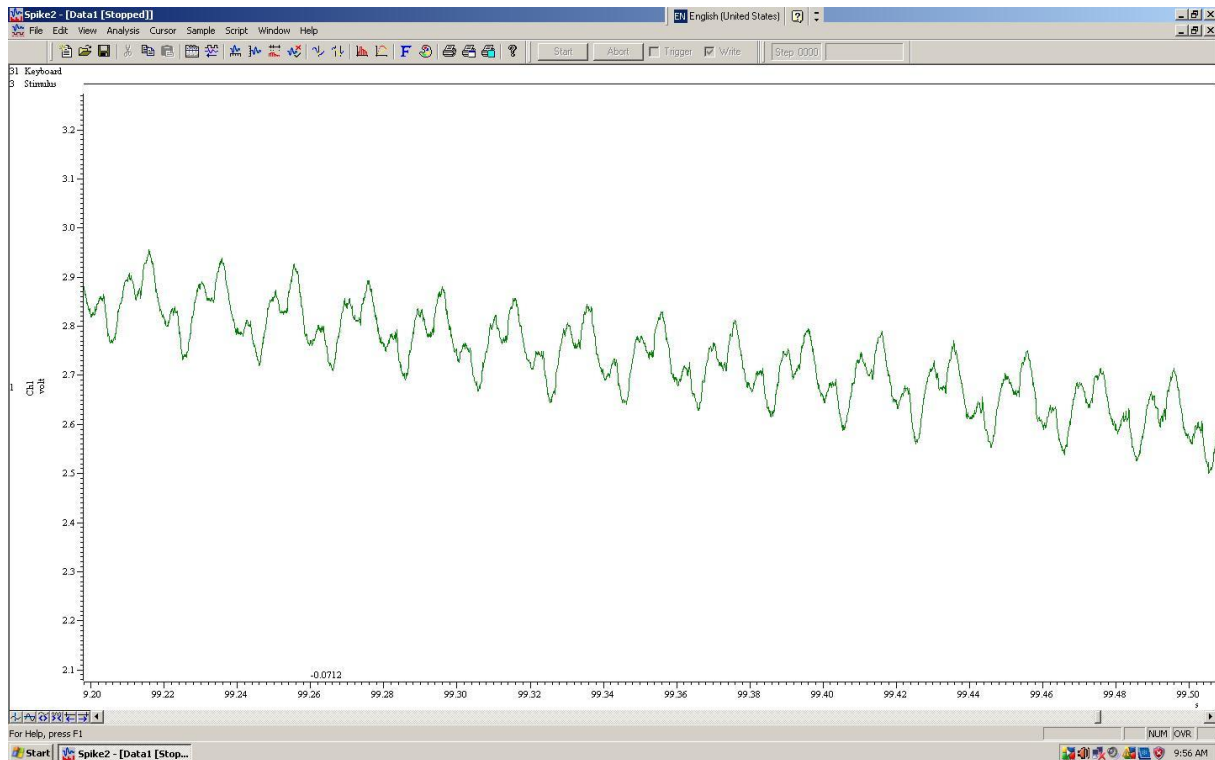
Mérőkamra: az elektronikus árnyékolt ketrecben található mikroszkóp, erősítő és egycsatornás, extracelluláris jelfelvevő a rögzítőkarokkal.

A glomerulusból felvett jelet egy analóg erősítőbe, majd egy CED 1440 típusú jelátalakítóba vezettük be. Utóbbi feladata az volt, hogy az analóg jelet bináris kódként értelmezze és a számítógépes program számára kezelhetővé tegye az adatokat. Az innen közvetített digitális adatot egy asztali számítógéppel vettük fel, melyen a Spike2 nevű program futott Windows XP alatt. A program képes rögzíteni és feldolgozni a felvett információt, valamint képes összhangban működni a stimulátorral. A mért adatokat egy Axoscope, Microsoft Excell és PAST nevű programok segítségével tudtuk kiértékelni.

(Tronson, Wiseman et al. 2012)

Stimulálás

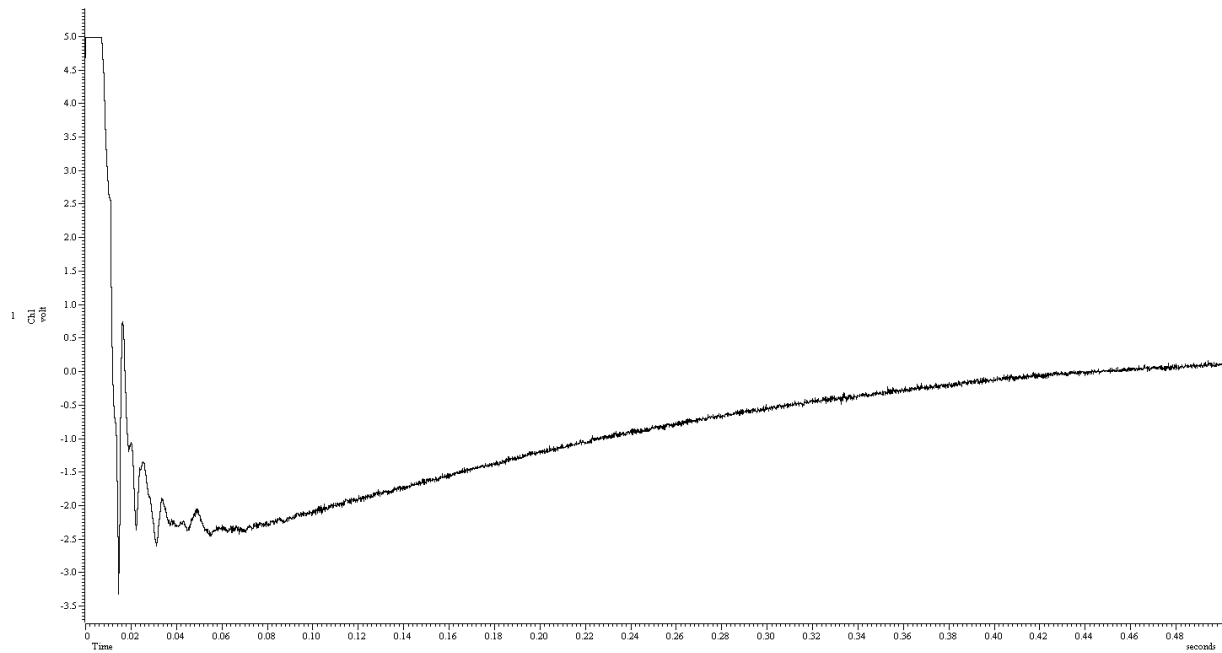
Az stimuláció erősségét (V) addig növeltük, amíg a mérő elektródán a stimulációs műtermék után megjelent a kiváltott válasz. Ezután a mérő elektróda pozícióját addig változtattuk, amíg az elektromos jel maximális nem lett.



Spike 2 grafikus felülete.

Elektromosan ingerelt jel mérése

A stimulátorral lehetőségünk nyílt elektromos ingerek kiváltására. A stimulátor jeleinek erősségének és ritmusának szabályozásával beállítottuk a legoptimálisabb jelet. A feszültséget 10V és 30V között határoztuk meg, ugyanis ebben a tartományban az áramütés már láthatóan kiváltja a glomerulusban megfigyelendő jelet, azonban még nem nyomja azt el a műtermékkel.

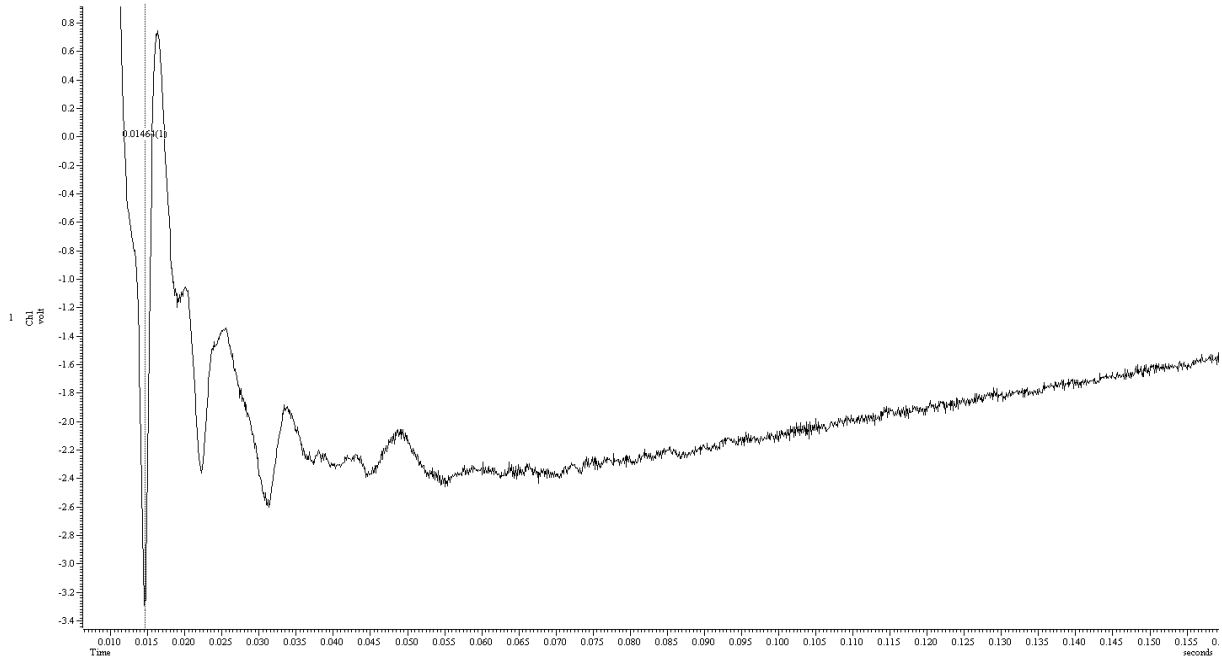


Receptor stimulálása szagmintával

A receptorok természetes működése az illatmolekulákkal való reakcióban valósul meg. Ezeket az illatanyagokat egy légpumpa segítségével tudtuk prezentálni a csápnak. A stimulátorral összekötve beállítottuk, hogy milyen időközönként és mennyi ideig fújja a csápot az illatkivonattal permetezett tartály. Amikor nem a szagmintával ellátott tartályból kapta a befújást a csáp, olyankor egy atmoszférikus levegővel töltött tartályra váltott a gép. Ily módon láthattuk a molekuláris stimulációt, mely prezentálódott a glomerulusban. A stimulációk között elegendő időt hagytunk, hogy a receptorok visszatérjenek alaphelyzetbe.

Eredmények

Több alkalommal folytattunk méréseket, melyekből végül kiválasztottuk azt, amikor a glomerulus működésének oszcillációs mechanizmusai prezentálhatóak. Ebben a mérésben mért adatokat a Spike 2 segítségével átlagoltuk és összevetettük őket egyetlen ábrára.



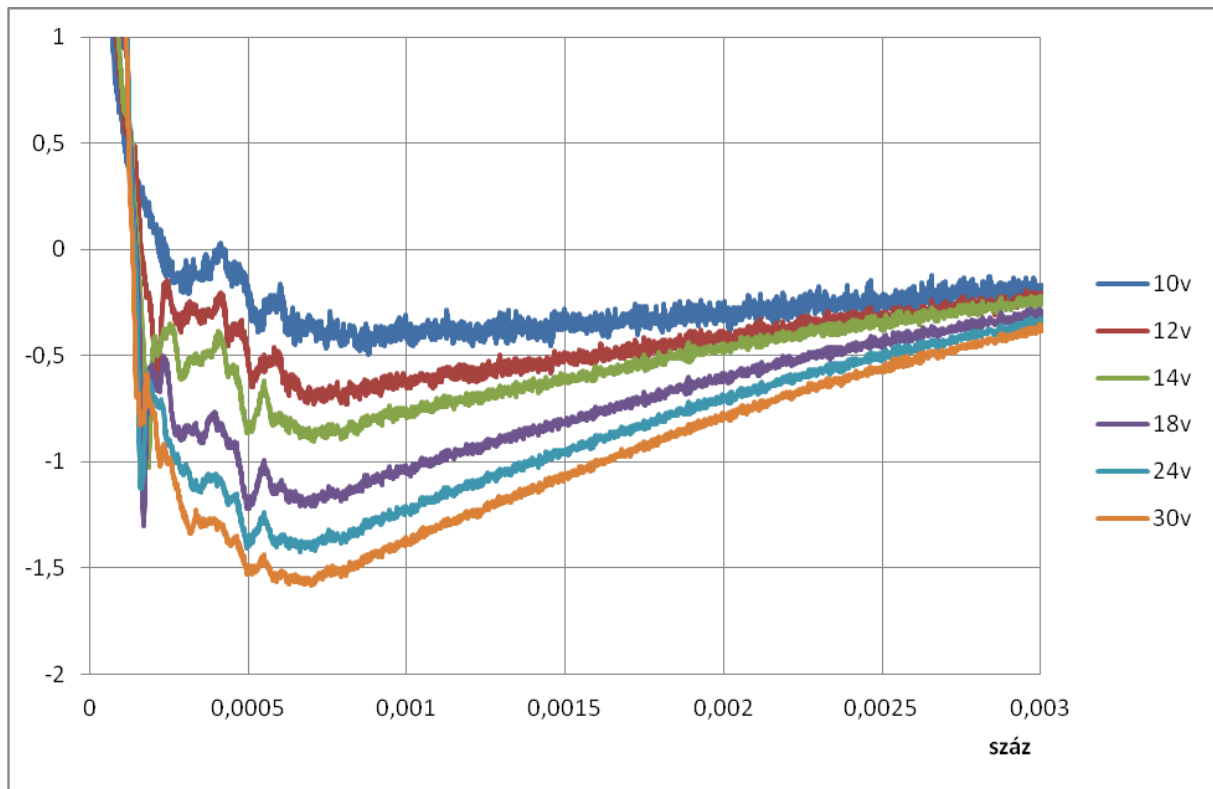
Spike 2 mérések átlagolva. A görbéről leolvashattuk, hogy hol tapasztalhatóak maximum és minimum csúcsok.

A mérés negatív és pozitív csúcsok egymást követően a következők voltak (az értékek ms-ben vannak megadva):

Pozitív csúcsok: 16,3; 20,1; 25,5; 33,7; 49

Negatív csúcsok: 14,6; 22,3; 31,1; 44

Az eltérő feszültségen mért eredményeket összevetettük egy excell táblázatban, ahol egy közös grafikonon ábrázoltuk.



Feszültségek átlag értékeinek ábrázolása. Program: Microsoft Excell. A vizsgálat során minden feszültségen 10-30db mérést végeztünk, melyek átlaga a fenti grafikonon látható.

Megvitatás

Dolgozatom során összefoglaltuk szaglórendszer működését és információfeldolgozásának kezdeti lépéseit az elérhető szakirodalom alapján. Részletesen kitértünk az evolúciós és anatómiai összefüggésekre, mely jellemzi a rovarokat és gerinceseket. A szakirodalom rámutatott arra, hogy a szaglás vizsgálata egy folyamatosan fejlődő, széles körben vizsgált tudományág, melynek hasznosítása elsősorban mezőgazdaságban és gyógyszeriparban teljeseedik ki. Rengeteg nyitva hagyott kérdés van azonban a tanulás és információfeldolgozás területén.

A kísérletek során több sáskát preparáltunk és vizsgáltunk eltérő módszerek segítségével. Ezek közül csak némelyik bizonyult eredményesnek, mert a zajszint optimalizálása vagy a mérőeszközök finomhangolása gyakran komoly nehézséget jelentett. A rendelkezésre álló eszközök segítségével sikerült mérnünk több alkalommal olyan jelenséget, mely megegyezik a csápi lebenyben történő oszcillációs folyamatokkal. Ezekből a mérésekből kiválasztottuk azt, ami a legjobban prezentálja a jelenséget. A különböző feszültségek más-más eredményt hoztak az intenzitást illetően. Alacsonyabb feszültségnél (10-14V) még gyakran a zajszinttel egyenlő az oszcillációs mechanizmus, magasabb intenzitáson (24-30V) azonban már jól elkülönülő íveket lehet megfigyelni. A jelenség nem más, mint a membrán rezgésének feszültségtovábbító folyamata.

A vizsgálatok során több technikai akadályt kellett áthidalnunk, mégis nagy segítséget jelentett az, hogy a tanszéken már volt példa hasonló eljárások elvégzésére. A munka során rengeteg tapasztalatot szereztem a kísérletek felépítésének gyakorlatias világáról.

Megismerkedtem több elektronikai berendezésekkel és azok hibalehetőségeivel, valamint gyakorlatomat bővítettem a rovarok preparálása és anatómiai ismereteiket illetően.

Dolgozatom hasznára válhat azoknak, akik szeretnének betekintést nyerni a témába, vagy egy friss összefoglalót keresnek a szaglórendszerrel kapcsolatban. A lehetőségek nyitva állnak kutatók vagy más szakdolgozók előtt: szagmintával történő stimulálás vagy más képalkotó eljárások alkalmazásával továbbhaladva.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Molnár Péternek, szakdolgozatom témavezetőjének, aki rengeteg segítséget és támogatást adott munkám során. Köszönöm továbbá a Nyugat-magyarországi Egyetem Savaria Egyetemi Központnak a tanulási és fejlődési lehetőséget, melyet kaptam az évek során.

Felhasznált irodalom

- Bazhenov, M., M. Stopfer, et al.: "Model of cellular and network mechanisms for odor-evoked temporal patterning in the locust antennal lobe." Neuron, 2001. **30**(2): 569-581.
- Bazhenov, M., M. Stopfer, et al.: "Model of transient oscillatory synchronization in the locust antennal lobe." Neuron, 2001. **30**(2): 553-567.
- Bishop, C. D. and B. K. Hall: "Sniffing out new data and hypotheses on the form, function, and evolution of the echinopluteus post-oral vibratile lobe." Biol Bull, 2009. **216**(3): 307-321.
- Choudhary, A. F., I. Laycock, et al.: "gamma-Aminobutyric acid receptor A-mediated inhibition in the honeybee's antennal lobe is necessary for the formation of configural olfactory percepts." Eur J Neurosci, 2012.
- Colasanti, M., T. Persichini, et al.: "Nitric oxide pathway in lower metazoans." Nitric Oxide, 2010. **23**(2): 94-100.
- Colasanti, M., G. Venturini, et al.: "Nitric oxide involvement in *Hydra vulgaris* very primitive olfactory-like system." Journal of Neuroscience, 1997. **17**(1): 493-499.
- Eisthen, H. L.: "Evolution of vertebrate olfactory systems." Brain Behav Evol, 1997. **50**(4): 222-233.
- Finelli, L. A., S. Haney, et al.: "Synaptic learning rules and sparse coding in a model sensory system." PLoS Comput Biol, 2008. **4**(4): e1000062.
- Guss, J., L. Doghramji, et al.: "Olfactory dysfunction in allergic rhinitis." ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, 2009. **71**(5): 268-272.
- Ha, T. S. and D. P. Smith: "Odorant and pheromone receptors in insects." Front Cell Neurosci, 2009. **3**: 10.
- Hansson, B. S. and S. Anton: "Function and morphology of the antennal lobe: new developments." Annu Rev Entomol, 2000. **45**: 203-231.
- Hansson, B. S. and M. C. Stensmyr: "Evolution of insect olfaction." Neuron, 2011. **72**(5): 698-711.
- Harini, K. and R. Sowdhamini: "Molecular Modelling of Oligomeric States of DmOR83b, an Olfactory Receptor in *D. Melanogaster*." Bioinform Biol Insights, 2012. **6**: 33-47.

- Ito, H. T. and E. M. Schuman: "Frequency-dependent signal transmission and modulation by neuromodulators." Front Neurosci, 2008. **2**(2): 138-144.
- Kay, L. M. and M. Stopfer: "Information processing in the olfactory systems of insects and vertebrates." Semin Cell Dev Biol, 2006. **17**(4): 433-442.
- Liljenstrom, H. and X. B. Wu: "Noise-enhanced performance in a cortical associative memory model." Int J Neural Syst, 1995. **6**(1): 19-29.
- Nores, J. M., B. Biacabe, et al.: "[Olfactory disorders in Alzheimer's disease and in Parkinson's disease. Review of the literature]." Ann Med Interne (Paris), 2000. **151**(2): 97-106.
- Petrulis, A. and H. Eichenbaum: "The perirhinal-entorhinal cortex, but not the hippocampus, is critical for expression of individual recognition in the context of the Coolidge effect." Neuroscience, 2003. **122**(3): 599-607.
- Raible, F., K. Tessmar-Raible, et al.: "Opsins and clusters of sensory G-protein-coupled receptors in the sea urchin genome." Dev Biol, 2006. **300**(1): 461-475.
- Raman, B., M. Stopfer, et al.: "Mimicking biological design and computing principles in artificial olfaction." ACS Chem Neurosci, 2011. **2**(9): 487-499.
- Reineke, R. (2008). "It's Right Under Our Noses: The Importance of Smell to Science and our Lives." Retrieved Tue, 01/08/2008, 2008, from <http://serendip.brynmawr.edu/exchange/node/1751>.
- Sekiguchi, T., H. Furudate, et al.: "Internal representation and memory formation of odor preference based on oscillatory activities in a terrestrial slug." Learn Mem, 2010. **17**(8): 372-380.
- Stopfer, M. and G. Laurent: "Short-term memory in olfactory network dynamics." Nature, 1999. **402**(6762): 664-668.
- Tabata, J., C. M. De Moraes, et al.: "Olfactory cues from plants infected by powdery mildew guide foraging by a mycophagous ladybird beetle." PLoS One, 2011. **6**(8): e23799.
- Tronson, D. A.: "The Odour, the Animal and the Plant." Molecules, 2001. **2001**, **6**: 104-116.
- Tronson, N. C., S. L. Wiseman, et al.: "Distinctive roles for amygdalar CREB in reconsolidation and extinction of fear memory." Learn Mem, 2012. **19**(5): 178-181.
- Vosshall, L. B.: "Putting smell on the map." Trends Neurosci, 2003. **26**(4): 169-170.

Wilson, R. I.: "Neural and behavioral mechanisms of olfactory perception." Curr Opin Neurobiol, 2008. **18**(4): 408-412.

Wilson, R. I. and Z. F. Mainen: "Early events in olfactory processing." Annu Rev Neurosci, 2006. **29**: 163-201.

Yaksi, E., B. Judkewitz, et al.: "Topological reorganization of odor representations in the olfactory bulb." PLoS Biol, 2007. **5**(7): e178.