

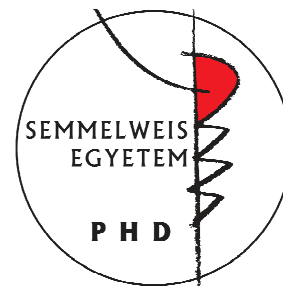
A napi és évszakos bioritmus beállításáért felelős corpus pineale felépítésének és innervációjának finomszerkezeti, cytokémiai vizsgálata emberben és különböző gerincesekben

Doktori tézisek

Dr. Maria João Manzano e Silva

A Semmelweis Egyetem Doktori Iskola

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola
Human Morfológiai és Fejlődés Biológiai Intézet



Konzulens: Dr. Vigh Béla, professor emeritus, az MTA doktora
Hivatalos bírálók: Dr. Buzás Péter, egyetemi adjunktus, Ph.D.
Dr. Székely Andrea Dorottya, egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke:

Prof. Szirmai Imre, egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. László Lajos, egyetemi docens, az MTA doktora CBSc docens

Dr. Gerber Gábor, egyetemi docens, C.Sc. CBSc docens

Bíráló bizottság elnöke: Dr. Kálmán Mihály, egyetemi tanár, az MTA doktora

Bíráló bizottság tagjai: Dr. Alpás Alán egyetemi docens, Ph.D.

Dr. Molnár Kinga, egyetemi adjunktus, Ph.D.

Budapest 2015

BEVEZETÉS

A corpus pineale fontos szereppel bír a **circadian és circannuális életritmus** kialakításában. Az egyes szervek normális napi ritmusát alapfokon önregulációs genetikai órák („slave clocks”) irányítják, amelyek 24 órás diurnális ritmust diktálnak. A különböző szervek napi ritmusát a hypothalamikus nucleus suprachiasmaticus („master clock”) koordinálja. A koordinált működést a föld különböző pontjain lévő megvilágítási biotóp viszonyokhoz állítják be a nemvizuális fotoreceptorok, elsősorban a corpus pineale.

A pineális **melatonin-hormon** képzését a fény gátolja, tehát a legtöbb melatonin éjjel ill. télen termelődik. A melatoninnak többek közt antigonadotrop hatása van, ami közvetlenül befolyásolja a hormonrendszer működését és ezzel a szervezet napi ill. évszakos ritmusát szabályozza. Az éjszakai mesterséges világítás gátolja a pineális melatonin termelődését aminek patológiás hatásai lehetnek, mint pl. nőben az emlőrák, vagy férfiben colorectális carcinoma.

CÉLKITŰZÉS

Az emberi corpus pinealéről az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz szükséges gyors fixálási lehetőség hiányában, kevés finomszerkezeti adat ismert (Fejér és mt.1989, Vigh és mt. 2003). A corpus pineale vizsgálata az irodalomban legtöbbször különböző kísérleti állatokban történik de mivel emberben lényeges kórtani szempontokat vet fel, indokolja jelen munka részletes *összehasonlító* finomszerkezeti és immúncitokémiai vizsgálatait,

A finomszerkezeti viszonyok pontos vizsgálatát az is szükségessé tette, hogy az újabb eredmények - a szerv korábban mirigyszövetnek tartott felépítésével szemben – annak *idegszöveti* karaktere utalnak.

A vizsgálatok megkezdésekor klinikailag a corpus pinealének gyakorlati röntgenológiai szerepe jelentős volt az agyi folyamatok diagnosztikájában. Ennek alapja a corpus pinealében lévő acervulusok jó leképezhetősége, ami segíti a térfoglaló kóros folyamatok korai felismerését. E problémakör motiválta a pineális *calcifikáció* vizsgálatát.

A pontosabb finomszerkezet és afferentáció-efferentáció ismerete mellett a pineális

szervek kémiai komponenseinek meghatározása is fontos a funkció jobb megértésében. E célt szolgálták az immuncitokémiai vizsgálatok, amelyek ugyancsak különböző fajok pineális szerveinek, valamint a retinális fotorecepciónak összehasonlításával történtek. A *hisztokémiai* meghatározásokban a fotokémiai működésben szereplő molekulák mellett a neurális afferentáció és efferentáció mediátor anyagainak meghatározása volt a vizsgálatok további célja.

Az irodalomban az emberi és emlős koponya fényáteresztő képességének csökkenése hozzájárult a pineális fényérzékelés regressziós elméletének kialakulásához. E kérdés pontosabb tisztázását célozta a *koponya* fényáteresztő képességének összehasonlítása. A beidegzésben az *autonóm rostok* szerepét vizsgáltuk.

MÓDSZEREK

Immuncitokémiai vizsgálatok

Beágyazás utáni elektronmikroszkópos immunreakciót végeztünk *GABA*, *glutamát* és *aszpartát* ellen. Használtunk továbbá *retinális opszin* antiszérumot, *pinopszin* antitesteket és monoklonális ellenanyagokat *OS-2*, *COS-1*, valamint *cryptochrom* ellenanyagot. A fixálástól és beágyazástól függően a primer antiszérumot 1:500-tól 1:5.000 hígításban használtuk.

A pineális fényafferentáció vizsgálata

A pineális fényafferentációban az irodalomban feltételezett retinális afferentáció vegetatív rostok által való közvetítését vizsgáltuk. A vegetatív rostok felismerésére *tyrozin hydroxiláz reakciót* végeztünk, polyclonalis és monoclonális ellenanyagokkal.

A másik vizsgálatcsoportban a koponyai fényáteresztő problémát vizsgáltuk, elsősorban emberben, különböző életkort összehasonlítva. E problémakör kapcsán került sor még a pineális calcifikáció vizsgálatára is, amelynek klinikai jelentősége mellett kiemeltük a calcifikáció fényreceptióval való kapcsolatát.

Vizsgált fajok

Emberen kívül a különböző emlős fajok, madárfajok, hüllők, kétéltűek, csontos és porcos halak, valamint körszájúak lettek vizsgálva a fejlett pineális fényérzékelésünek tartott *submammaliák* és a regresszivnek ítélt *emlősök pineális szerveinek*

összehasonlításához. A következő fajokat vizsgáltuk:

Emlősök: Cercopithecus aetiops; Rhesus macacus (majmok);
laboratoriumi patkány; egér; macska; északi oposzum; Didelphys virginiana; Erinaceus
roumanicus; Sorex araneus; Putorius furo; Mustela vison; Martes foina; Oricotolagus
cuniculus;

A *denevérek* közül: Myotis blythi oxygnatus; Rhinolophus ferrum equinum;
Taphozous longimanus; Scotophylus hethai; Pteropus temmincki; Cynopterus sphinx;
Rousettus niloticus (egypticus).

Madárfajok: Gallus domesticus; Numida meleagris; Phasianus cochicus; Coturnix
coturnix japonica; Meleagris gallopavo; Columba livia; Anser anser; Anas platyrhynchos,
Passer domesticus; Taeniopyga guttata, Turdus merula; Turdus viscivorus; Serinus canaria;
Parus major; papagály, Melopsittacus undulatus; Buteo buteo; Struthio camelus.

Hüllők: Lacerta viridis; Lacerta agilis, Lacerta muralis, Iguana iguana, Teratoscincus
scincus, Phelsuma laticauda angularis; Emys orbicularis; Pseudemys scripta elegans;
Anolis carolinensis; Phelsuma laticauda; Iguana iguana; Natrix natrix; Natrix tessellata;
Elaphe longissima.

Kétéltűek: Triturus cristatus; Triturus punctatus; Pleurodeles waltlii; Salamandra
maculosa; Amblystoma mexicanum; Bombina bombina; Bombina variegata; Pelobates
fuscus; Rana esculenta; Rana arvalis; Bufo bufo; Bufo viridis; Xenopus laevis; Hyla
regilla.

Csontos halak: Cyprinus carpio; Phoxinus phoxinus; Salmo gairdneri; Carassius
auratus; Anguilla anguilla.

Porcos halak: Raja clavata; Scyliorhinus canicula; Chimaera monstrosa.

Körszájú: Lampetra planeri.

EREDMÉNYEK

ÖSZEHASONLÍTÓ MORFOLÓGIA

Saját vizsgálataink előtt felnőtt emberi corpus pineáléről finomszerkezeti adatok nem voltak. A szerv elektronmikroszkópos vizsgálata szerint a corpus pineale az epithalamusból fejlődik, nem perifériás mirigy szerkezetű, hanem retina-jellegű agyszövet,

amelyet csap-típusú fotoreceptor pinealocyták, másodlagos pinealis neuronok és gliasejtek képeznek. Ezért nem használtuk a szokásos „tobozmirigy”, „pineal gland” nevet, helyettük a „tobozszerv”, „pineal organ” megnevezést, ami e kérdéssel közvetlenül nem foglalkozók figyelmét is felhívja hogy a szerv nem mirigy - hanem idegszövet jellegű.

Az emlős corpus pineale felépítése

Az emlősök pinealocytaí az emberéhez hasonló finomszerkezetűek. Csak néhány emlősben mutatják az alacsonyabbrendűekre jellemző differenciált fotoreceptor kültag felépítést, többségükben a kültagot speciális érzőcsilló képviseli. A pinealocyta axonok egyrésze neurohaemális idegvégződést képez a szerv vasculáris felszínén. Másrészük ribbon tartalmú szinapszist képez pineális neuronokon, ami a retinális fotoreceptor-bipoláris neuron kapcsolatának felel meg.

Denevérekben részletesebb összehasonlítást végeztünk a corpus pineale és a retina között. A mikrochiroptera fajok retinája megfelelni látszik a vizuális látás éjszakai életmódból eredő csökkent jelentőségének. A megachiroptera fajok redőzött retinája nem lehet alkalmas arra, hogy ernyőszerűen fogadja a külvilágról rávetített képet és lokátorként jelezze a külvilág tárgyait. Ezért feltételezzük, hogy ez a „corpus pineale-szerű retinaszerkezet” a tobozszervhez hasonlóan fotométer működésre, tehát elsősorban a fényintenzitás mérésére szolgál ezekben a fajokban.

Madarak corpus pineáléja

Az elmúlt négy évtizedben több mint 700 cikk jelent meg a madarak pineális szervéről, de relative kevés adat ismeretes a szerv finomszerkezetéről. Saját munkánkban ezért először a szerv fény- és elektronmikroszkópos felépítéséről kívántunk részletes adatokat szolgáltatni.

Saját munkánkban vizsgált fajokban a pineális szerv közvetlenül a koponya alatt helyezkedik el és hosszabb pineális nyél köti az epithalamushoz. A szerv fala zsákszerű kitüremkedéseket képez, s mivel a harmadik agykamra tetőlemezéből fejlődik külső felszínét a diencephalikus pia mater és arachnoidea borítja. Az agyhártyák mélyen betérjednek a recessusok mentén a szervbe, de mindvégig szeparálódnak a pineális idegszövettől lamina basalisok útján.

A pinealocyták a neuronokhoz hasonlóan bipolárisak: receptor és effektor nyúlvánnyal

rendelkeznek, a *receptor nyúlvány* dendrit-jellegű, terminális megvastagodása a retinális csapokhoz és pálcikákhoz hasonló beltágot képez. A pinealocyták *effektor nyúlványa* axon-jellegű, és vagy a secunder pineális neuronokon végződik, vagy neurohormonális terminálisokat képez a pineális idegszövet felszínén. A neuronokon nemcsak pinealocyta axonvégződéses találhatók, hanem azok ribbonos végződéseitől eltérő axonterminálisok is, amelyek interneuronális kapcsolatokat, vagy pinealopetális afferenciációt képviselhetnek.

A pineális agyhártyákban a szervhez jövő vegetatív rostok - emlősökhöz hasonlóan - nem pineális sejteken, hanem a szerv erein végződnek, vasomotor terminálisokat képezve.

Hüllők pineális szervei

A vizsgált fajokban kétfajta pineális szerve corpus pineale és parietális szem található.

A *corpus pineale* intracraniálisan fekszik nagyobb a parietális szemnél és lebenyezett. Az epithalamussal a habenulák, pineális nyelvek kötik össze. A pinealocyták differenciált fotoreceptor kültagjai vannak, axonjuk ribbon tartalmú szinapszisokat képez a pineális neuronokon. Vegetatív idegrostok a hüllő corpus pinealéjában is az erek körül végződnek.

A *parietális szem* dorzális lencséből és ventrális retinából áll, felette a fejtető transzparens „cornea” része helyezkedik el. A hólyagalakú szerv nem lebenyezett, de citológiai szerkezete a corpus pinealéhoz hasonló. A parietális szem feletti fejtetői cornea lehetővé teszi a fénynek a szervhez való bejutását, míg a corpus pinealéhoz közvetlenül csak a koponyán keresztül juthat - jelentősen megszárt - fény.

Ismert, hogy a hüllők (nevük is innen ered) gyakran tartózkodnak a biotóp napsütötte területein a testhőmérsékletük szabályozására. Feltételezzük, hogy a kétféle pineális szerv eltérő fényérzékelése egyrészt a napszakos és évszakos *fényritmus* változásának érzékelését (corpus pineale) végzi, másrészt pedig a napsütötte területek hőreguláció érdekében való felkeresését segíti (parietális szerv).

Kétéltűek pineális szervei

Saját munkánkban kétéltűek közül békafajokat vizsgáltunk, ahol pineális szerv és frontális szem található..

A *frontális szem* vagy holokszem a corpus pinealénál kisebb, a koponyán kívül helyezkedik el a fejtető bőrében, a szemek feletti és közötti fejterületen. A szervet fedő

pigmentmentes bőrfolt teljesen áttetsző és szinszűrő aktivitása nem észlelhető. A fotoreceptorok között mind pálcika, mind csap típusúak előfordulnak axon jellegű nyúlványuk ribbonos szinapszissal végződik a szerv idegsejtjein. A neuronok axonjai mint „homlokideg” csatlakoznak a corpus pinealéból a habenuális, pretektális és tegmentális agytörzsi régiókhoz és a hypothalamikus periventriculáris areába menő idegrostokhoz.

A békák *pineális szerve* a homlokszemnél nagyobb, a koponyatető alatt, a frontális szemnél caudálisabban fekszik. A fényérzéksejtek között szintén lehet pálcika és csaptípusú sejteket találni, amelyek axonja a pineális neuronokon végződik. A terminálisokban synaptikus vezikulákon és szemcsés vezikulákon kívül, szinaptikus ribbonok találhatóak. A pineális neuronok axonjuk a pineális rostösszeköttetésekhez követhető. A rostok neurohormonális idegvégződéseket is képeznek. Ez a pineális neurohormonok, köztük a melatonin lokális hormonnaként való ürülését jelenti. A szerv feletti fényáteresztő koponyarész a naps területek felkeresését segítheti.

A legfeltűnőbb jellegzetessége a béka pineális szerveinek, a több típusú fényreceptor sejtek jelenléte, amit az immunitokémiai fejezetben vizsgálunk.

Halak pineális szervei

Csontos halakban a *corpus pineale* fotoreceptor kültagjai beemelkednek a szerv lumenébe, ami folytatása a harmadik agykamra a recessus pineálisának. A pineális neuronok a retina secunder neuronjaihoz hasonlóan a fotoreceptor pinealocyták fényinformációját veszik át és továbbítják a tractus pinealis útján.

A *parapineális szerv* felépítése hasonló, de az egyes elemek differenciáltsága a corpus pineale sejtjeinél alacsonyabb.

A *porcos halakhoz* tartozó rájában és cápákban parapineális szerv nincsen, a corpus pineale hosszabb cső formájában differenciálódik, ahol a szerv kettősségét proximális és disztális kiszélesedés jelzi. A fotoreceptor pinealocyták túlnyomórészt pálcika jellegűek és kétféle glutamaterg neuronnal szinaptizálnak. A neuronok axonjai képezik a tractus pinealist amely a thalamus pretektalis areájában, a tuberculum posterius idegsejtjein, a tegmentum mesencephaliban és a középagyi GnRh neuronokon végződik.

Vizsgálatainkban elsősorban a fotoreceptor kültagok fejlettségét hasonlítottuk össze

differentiáltabb fajokkal és azoknál fejlettebbnek találtuk. A szerv lumenébe és a harmadik agykamra recessus pinealisába jelentős számú dendrit figyelhető meg, amelyekre szintén a csillós végződés jellemző az agykamrai liquorkontakt neuronokhoz hasonlóan.

Körszájúak

A körszájú *Lampetra* fajokban a pineális szerveket a corpus pineale és a parapineális szerv képviseli. Mind a *pineális szerv*, mind a *parapineális szerv* fotoreceptor sejtekből és secunder neuronokból valamint endymasejtekből áll. A pineális szerv közvetlenül a koponya alatt helyezkedik el, míg a parapineális érzékszerv mélyebb helyzetű.

A pineális fotoreceptorsejtek kültagjainak membránrendszere fejlett, kifejezett rhodopsin immunreaktivitást mutat (lásd az immuncytokémiai részben).

CITOKÉMIAI VIZSGÁLATOK

A citokémiai vizsgálatokban a pineális szervek fotorecepciójában szereplő molekulák (1), a pineális afferentáció ill. efferentáció mediátoranyagai, (2) valamint a pineális calcifikáció (3) lett vizsgálva. A fotorecepcióban szereplő molekulák közül retinális (A) és pineális (B) opszinok lettek vizsgálva.

Retinális opszinok vizsgálata pinealocytákban

Vizsgálatainkban porcos halat és körszájút vizsgáltunk. Rájában (*Raja clavata*) fénymikroszkópos immunreakciót végeztünk, ami a kültagokban adott pozitívítást.

Hasonlóan a körszájú *Lampetra fluviatilis* pineális fotoreceptor-sejtjeinek kültagjai rhodopszin immunreakciót adnak.

Pinopsin lokalizációja pineális fotoreceptorokban

Pinopszin specifikus antitestekkel *számos madárfaj* pinealocytaínak kültagjában találtunk reakciót. Abszorpciós maximum mérések alapján e fotoreceptorok zöld-kék érzékenyek. Legkifejezettebb pinopszin immunopozitivitás a *gyíkfélék* nagy pinealocytaíban volt észlelhető, a kisméretű pinealocyták OS2 antitesttel mutattak jelölést.

Béka pálcika-jellegű pinealocytákban mutatható ki pinopszin immunoreakció.

Szinaptikus mediátorok vizsgálata

A mediátorok közül az excitatorikus aminosavak: glutamát és aspartát, valamint a gátló GABA került vizsgálatra.

Emlősökben a kisméretű pineális neuronok adnak GABA immunreakciót és GABA-erg terminálisokat képeznek a pinealocytákon és a nagyméretű neuronokon. A pinealocyták axonális végződése a nagyméretű pineális neuronokon glutamát immunreakciót adnak.

Hüllőkben a pinealocyták axon-jellegű nyúlványai glutamát immunreakciót adnak, elsősorban a szinaptikus ribbonok. *Kétélűek* pinealocytaiban mind aspartátot, mind glutamátot lehetett kimutatni a szinaptikus ribbonokon.

Pinealocyták axon-jellegű nyúlványai glutamát-immunreaktív végződéseket képeznek a pineális neuronok dendritjein. A pineális neuronok axonjai alkotják az ugyancsak glutamát immunreaktív tractus pinealist.

A körszájú *Lampetra fluviatilis* pineális és parapineális szervében ugyancsak kimutathatók az immunreaktív aminosavak.

A glutamát immunreakció legerősebb a fotoreceptorok és a szekunder neuronok preszinaptikus terminálisában. Hasonló jelenség ismert a retinára vonatkozólag is, ezért valószínű, hogy az excitatorikus aminosavak hasonló szinaptikus mediátor szereppel bírnak a pineális szervekben mint a retinában.

Pineális kalcifikáció

Saját munkánkban a corpus pineálékból készült fénymikroszkópos metszeteket Kossaféle calciumkimutatással festettük. Elektronmikroszkópos célra pyroantimonátos calciumkimutatást használtunk. Ez utóbbi eljárás a szabad calcium ionokat Ca-pyroantimonát formájában kicsapva, jó lokalizációval, elektrondenz szemcsék formájában teszi láthatóvá.

Emberi anyagunkban - az irodalmi adatokkal egybehangzóan - megállapítható, hogy a pineális konkrementumok száma nagyobb idős egyéneknél. Emberi pineális acervulusokat scanning elektronmikroszkóppal is vizsgáltunk, ahol jól megfigyelhető az acervulusok térhelyezete.

Pineális acervulusokat számos **emlősben** is találhatunk mint majomban, szarvasmarhában, lóban, szamárbán, juhokban, tengerimalacban, mongol futóegérben, nyércben, patkányban és denevérben. Kontrollként a metszeteket EDTA decalcinálásnak vetve alá, e szemcsék elektrondenz anyagukat elvesztik, mutatva azok calcium-jellegét.

Pyroantimonát módszerrel Ca felhalmozódás mutatható ki a retinában is a fotoreceptor sejtmembránja mentén.

Emlősöket submammaliákkal összehasonlítva, csak **madarakban** figyeltünk meg acervulusképződést. Felnőtt lúd corpus pinealéjában az emlősökhöz hasonló szerkezetű és elsősorban meningeális elhelyezkedésű agyhomok található.

Kételtűek pineális fotoreceptor kültagjaiban a sejtmembránokon nagyszámú Ca-pyroantimonát szemcse csapódik ki, elsősorban a pálcika-típusú kültagokban. Ez a lokalizáció teljesen megegyezik a retina kültagjaiban látható pyroantimonát reakcióval.

A fényinformáció pineális afferentációja

Az evolúció folyamán a pinealocyták fényreceptorai, fotoreceptor kültagjai redukálódnak és a koponya fényáteresztő képessége csökken. Felmerül a kérdés, hogy a pineális szervek működését magasabbrendűekben a fényinformáció hogyan irányítja?

Az egyik lehetőséget a retinából érkező rost-afferentáció jelenti. A másik kérdés, hogy elérheti-e a fény a differenciált koponyán keresztül a szervet?

A vegetatív pineális afferentáció

Az irodalmilag feltételezett (Korf, 1995) vegetatív afferentációt számos fajban vizsgáltuk. Az összes fajban a vegetatív rostok erek mentén érkeznek a corpus pineáléba annak meningeális tokja felől és a szerv interfollukuláris meningeális sövényeiben jutnak a szerv belsejébe. A legtöbb rost velőtlen, de köztük velős rostok is megfigyelhetők. Idegrostok nemcsak a corpus pineálét ellátó artériák mentén érkeznek, hanem a vena cerebri magnába ömlő vénák mentén is (*nervus conarii*).

Az idegeket sorozatmetszeteken követve nem lépnek be magába a pineális idegszövetbe, hanem a meningeális sövényekben maradnak és idegvégződéseket képeznek a pineális arteriolák simaizomsejtjein. Az axonok terminális részében számos szinaptikus vezikula és szemcsés vezikula található.

Mind a periarteriális, mind a perivenális rostok mutatnak *tyrosin hydroxiláz* reakciót. Jelen vizsgálatok a pineális ereken végződő terminálisok a vegetatív rostok **vazomotor** természetét mutatják. A tirozinhydroxiláz-immunoreaktív rostok vazokonstriktor, míg a

negatívak vazodilator, vagy vazosensor rostokat reprezentálhatnak. Hasonló funkciót már korábbi szerzők is feltételeztek (Holmgren 1917, Quay és mtsai 1968, Owman és Rudeberg 1970, Reuss és Schröder 1988, Moller és Baeres 2002). Úgy gondoljuk tehát, hogy a vegetatív rostok kísérletesen észlelhető szerepe a pineális működésben nem a retinális fényinformáció szimpatikus rostú vezetésével, hanem a szöveti működés *érellátási alátámasztásával* magyarázható.

Retinális fényinformáció a corpus pinealéba a habenuákon keresztül érkező centrális rostok útján idegszövettenilag és élettanilag inkább feltételezhető. Vazomotor végződéseket emellett nemcsak emlős corpus pinealéban, hanem a fejlett fényérzékeléssel rendelkező submammaliákban is találtunk.

A koponya fényáteresztő képessége emberben és különböző gerincesekben

Az irodalomban az emlős és emberi koponyát nem tartják fényáteresztőnek és a pineális fényérzékelés visszafejlődését feltételezik a submammaliák fényérzékelő pineális szerveivel szemben. Saját korábbi vizsgálatainkban azt találtuk, hogy nemcsak néhány gerinces kísérleti állatban hanem emberben is látszik a koponyán számos fényáteresztő terület. Saját munkánkban emberi, emlős (majom, macska, patkány, nyúl, tengeri malac) koponyáit 60 Wattos lámpával világítottuk át a fényáteresztő képesség kimutatására.

Az emberi koponya újszülöttben mutat a legnagyobb fényáteresztő képességet, elsősorban a kutacsok területén. A szülők figyelmét is fel kellene hívni arra, hogy a napi alvásidő alatt a sötétség fenntartása is szükséges a melatonin megfelelő termeléséhez, mert a gyerekek egyrésze világosban alszik.

Felnőttben a foveolae granulares és a meningeális erek árka (sulcus arteriae mediae) mutat a legerősebb fényáteresztő képességet. A Pacchioni granulációk száma nagyobb idősebb koponyákban. Átlátszó még a sinus sagittalis superior a frontális parietális és occipitális koponyacsont pikkelyrésze, valamint az emissarium vénák járatai és több egyénileg változó átlátszó terület a kálvária különböző részein. Szerepet játszik még a fény corpus pinealéhoz való eljutásában a liquor cerebrospinalis is.

Jelen vizsgálati eredményeket figyelembe kellene venni az éjjeli ügyeletben és a többműszakos munkában dolgozóknak is, ahol ugyancsak az alváshiány mellett a koponya megvilágításának csökkentése a keletkezett melatonhiányt csökkentheti.

KÖVETKEZTETÉSEK

A corpus pineale felépítése emberben és különböző gerincesekben.

Emberi corpus pineale sorozatmetszetekben való fény- és elektronmikroszkópos vizsgálata azt mutatja, hogy a pineális szövet az epithalamikus idegszövet folytatása. A corpus pineale az epithalamikus evaginációkból fejlődik. A corpus pineale tehát nem tekinthető mirigyszövetnek, hanem *idegszövet*.

A corpus pineale citokémiai vizsgálata

A pineális szervek mirigyszövet jellege ellen szólnak az immúncitokémiai vizsgálatok is, amelyekkel a *retinális* fototranszdukciós kaszkádjában ismert molekulákat lehetett kimutatni. Fotoreceptor molekulák nemcsak cyclostomatákban, halakban és kétéltűekben, hanem hüllőkben, madarakban és emlősökben valamint emberi corpus pinealében is detektálhatók. A *pinopsin* immunreakció madarak és hüllők pinealocytaiban kifejezett, emlősökben kisebb fokú volt. A kimutatott fotoreceptorok alkalmasak a szervezet cirkadián, ill. cirkannuális ritmusának kialakítására a pineális melatonin termelés útján.

Pineális calcifikáció

Saját vizsgálatainkban kálium pyroantimonáttal *emberi* corpus pinealében szabad calcium ionok voltak kimutathatók ultrastrukturálisán a sejtmembránok mentén, ami a membránok szerepét húzza alá az acervulusképződésben. Az intrapineális acervulusok globuláris felszín mutatnak, míg az arachnoideában lévőket elsősorban koncentrikus világosabb-sötétebb gyűrűk alkotják. A világos gyűrűk több kalciumot tartalmaznak, mint a sötétek. A legnagyobb acervulusok rétegeinek száma az életkorral korrelál.

Emlosök pineális acervulusai főleg meningeális típusúak. Parathyroidectomiás patkányokban nagyobb számú és méretű acervulus található, ami a calciumháztartást szabályozó parathyroidea szerepére utal az acervulus képződésben.

A legtöbb *submammaliában* a pineális szervek (corpus pineale, parapineális szerv, frontális szem, parietális szem) szerkezete a retinához hasonló. Acervulusokat csak néhány madár corpus pinealéjában lehetett kimutatni.

A vékonyfalú retinában és a submammaliák hasonló szerkezetű corpus pinealájában az extracelluláris kalcium diffúziója feltehetően akadálytalan, szemben a nagyobb és kompakt emlős pineális szövettel, ahol a kalcium lokális koncentrációja nagyobb lehet.

A corpus pineale efferenciája és afferenciája

Elektronmikroszkópos vizsgálatok mutatják, hogy madarakban több neurohormonális terminális található a corpus pineáleban, mint emlősökben. A madarak az evolúcióban az emlősökkel *párhuzamosan* fejlődtek, ezért – az általános felfogással szemben – nem tekinthetők a hüllők és emlősök közti átmenetnek.

A pineális efferenciával kapcsolatban szükséges aláhúzni, hogy a pinealocyták effektor polusát axonális nyúlvány képezi, amely vagy secunder pineális idegsejteken *képez szinapszist*, vagy felszíni *neurohaemális terminálissal* végződik. Galambban a felszíni terminálisok szemcsés vezikuláiban serotonin immunreakció volt kimutatható. Immunreaktív *aszpartát* és *glutamát* is található a végződéseken. Az excitatorikus aminosavaknak a neurohypophysis hormonális efferenciájában speciális regulatív hatással bír, ami a pinealis hormonális efferenciában is feltételezhető.

A pineális afferenciával kapcsolatban ki kell emelni, hogy az eddigi irodalomból jól ismert, hogy éjszakai megvilágítástól gátolt melatonin szekréció a fő endokrin faktor, ami előidézi ezeket a kóros jelenségeket (Kayumov és mt., 2005; Reid és Zee, 2004; Copinschi, 2005; Navara és Nelson, 2007; Brainard és mt., 2008; Blask, 2009; Folken és mt., 2010; Halder és Ahmad, 2010).

Mivel kísérletes vizsgálatok kimutatták sympathicus idegek szerepét a pineális melatoninképzés napi ritmusában, feltételezték, hogy vegetatív rostok közvetítenek fényinformációt a retinától a pineális fotorecepció regressziójakor (Wurtman és mt., 1964; Romijn, 1975; Bowers és mt., 1984; Reiter, 1991; Moore, 1996; Simoneaux és Ribelayga, 2003; Mukuda és mt., 2009). Saját vizsgálatokban a vegetatív rostok ereken végződtek, tehát *vazomotor* rostként befolyásolhatják csak a melatonin képzést.

A *koponya fényáteresztő képessége* emberben újszülöttkorban a legkifejezettebb a kutacsoknak megfelelően. A fonticulus major a második életévben calcifikálódik, a többi kutacs korábban. Ez az időperiódus fontos a napi és évszagos ritmus kialakulásában.

Felnőttben a fény a Pacchioni granulációknál jut át a koponyán és a meningeális arteriák árkainál, valamint a sinusok területén és az os occipitale pikkelyrészén.

A vizsgált emberi koponyák felerészében *individuais átlászó területek* is találhatóak, ami a pineális melatonintermelésben egyéni különbségeket hozhat létre. Éjszakai munkát

végzőknél a koponya fényáteresztőképességét preventive indokolt vizsgálni.

A vizsgált *emlős állatokban* a koponyatető egész területe transparens.

Hüllőkben és kétélűekben körülírt csontszövet mentes koponyaterület és pigmentmentes bőrterület található a pineális szervek felett.

A *halak* esetében számolni kell a víz sugárszűrő hatásával ami elsősorban a rövid hullámhossz-tartományokban érvényesül.

Vizsgálataink alapján javasolható, hogy éjjeli műszakban a rövid hullámhosszú fényt kiszűrő vörös szemüveg mellett a koponyát is fedni kell - különösen kevés, világos hajmennyiség esetén - a melatonin szekréció patológiai következményeinek csökkentésére.

Javasoltuk az éjjeli ügyelet megvilágításában a rövid hullámhossz csökkentését is amire a pineális metoninképzés kiemelten érzékeny.

ÖSSZEFOGLALÁS

A corpus pineale felépítése emberben és különböző gerincesekben.

Emberi corpus pineale sorozatmetszetekben való fény- és elektronmikroszkópos vizsgálata azt mutatja, hogy a szerv az epithalamussal folyamatosan függ össze, nem tekinthető mirigyszövetnek, hanem idegszövetnek: nem „toboz mirigy”, hanem **toboz szerv**.

Emlősök pinealocytái az emberéhez hasonló finomszerkezetűek. *Denevérekben* részletesen összehasonlítottuk a corpus pineale és a retina szerkezetét. A megachiroptera fajok retinája redőzött, nem lehet alkalmas arra, hogy ernyőszerűen fogadja a külvilágról rávetített képet. Ezért feltételezzük, hogy nem látásra, hanem a tobozszervezhez hasonlóan fényintenzitás mérésére szolgál ezekben a fajokban.

Szubmammáliában az un. pineális complexumot a diencephalon tető-lemezéből képződött két szerv képezi: hüllőkben a corpus pineale és a parietális szem, békafajokban a pineális szerv és a frontális szerv (frontális szem), körszájkúakban és csontos halakban pedig a pineális és parapineális szerv. Feltételezzük, hogy a két szerv egy *ősgerinces* páros dorzális diencephalikus szeméből ered.

A corpus pineale citokémiai vizsgálata

Fotoreceptor molekulák nemcsak cyclostomatákban, halakban és kétélűekben, hanem

hüllőkben, madarakban valamint emlősök corpus pinealéban is detektálhatók.

Elektronmikroszkópos vizsgálataink mutatják, hogy madarakban több neurohormonális terminális található a corpus pinealéban, mint emlősökben, tehát szekréciósan aktívabb mint az emlős corpus pineale. A differenciáltabb fajok nagy és redőzött pineális szervében a pinealocyták száma nagyobb emellett a benne található fotoreceptor *pinopszin* molekula hosszabb aktivációs ideje is növelheti a fényérzékenységet.

A corpus pineale efferenciációja és afferenciációja

Emberben, emlősökben és primitívebb gerincesekben egyaránt vannak pineális neuronok amelyeken a pinealocyták axonja végződik. A neuronok axonja a corpus pineale nyelén át a habikuláris magokba fut. A pinealocyták axonok egyrésze neurohormonális idegvégződést képez a szerv vasculáris felszínén ami a pineális hormonok szekréciójára szolgál. Vegetatív idegrostok nem végződnek pinealocytákon, nem lépnek be a pineális idegszövetbe, hanem ereken végződve érzékszervi jellegűek. A pineális idegszövetben is találhatóak centrális rostok, amelyek közvetíthetnek afferenciációt a szervbe.

A corpus pineale a koponyán keresztül is kap fényinformációt, elsősorban submammillárisban, de emberben is. Emberben a kutacsok záródásáig kifejezett a fény bejutása, de felnőttben is átjut a fény a sulci arteriosin és a foveolae granulárisan.

PUBLIKÁCIÓK

1. Vigh-Teichmann I., Vigh B., **Manzano e Silva MJ**, Aros B. The pineal organ of *Raya clavata*: opsin immunoreactivity and ultrastructure. *Cell Tissue Res.* 1983. 228:139-148.
Impakt: 1,777
2. Vigh B, Vigh-Teichmann I, **Manzano e Silva M.J**, van den Pol A.N. Cerebrospinal fluid-contacting neurons of the central canal and terminal ventricle in various vertebrates. *Cell Tissue Res.* 1983. 231, 615-621. **Impakt: 1,777**
3. Vigh B, **Manzano e Silva MJ**, Vigh-Teichmann I. Pineal organ and retina. Immunocytochemical similarity. VIth Int. Symp. Morphol. Sci. Lisbon July 23-28. 1984. Abstr. p.151.
4. Vigh B, Debreceni K, **Manzano e Silva MJ**. Similar localization of immunoreactive

glutamate and aspartate in the pineal organ and retina of various nonmammalian vertebrates. *Acta Biol Hung.* 1995. 46:99-106. ***Impakt: 0,227***

5. Vigh B, Fejér Zs, **Manzano e Silva MJ**. Immunocytochemistry of excitatory amino acids in the pineal organ and related structures of the brain stem. *Clin. Neurosci. Suppl.* 1995. 48:26-28. ***Impakt: 1,049***

6. **Manzano e Silva MJ**, Fejér Zs, Debreceni K, Vigh B. Neural and hormonal efferentation of pinealocytes. *Cell Biol Internatnl.* 1996. 20. 242. ***Impakt: 1,067***

7. Debreceni K, **Manzano e Silva MJ**, Ghosh M, Haldar C, Vigh B. Mediator substances in the pineal neuronal network of mammals. *Neurobiol.* 1997. 5: 459-467.

8. Fejér Zs, Szél Á, Röhlich P, Görcs T, **Manzano e Silva MJ**, Vigh B. Immunoreactive pinopsin in pineal and retinal photoreceptors of various vertebrates. *Acta Biol Hung* 1997. 48:463-471. ***Impakt: 0,136***

9. Debreceni K, Fejér Zs, **Manzano e Silva MJ**, Vigh B. Immunoreactive glutamate in the pineal and parapineal organs of the lamprey (*Lampetra fluviatilis*). *Neurobiol.* 1997. 5:53-56.

10. Vigh B, Szél Á, Debreceni K, Fejér Zs, **Manzano e Silva MJ**, Vigh-Teichmann I. Comparative histology of pineal calcification. *Histol Histopathol.* 1998. 13:851-870. ***Impakt: 2,194***

11. Vigh B, Röhlich P, Görcs T, **Manzano e Silva MJ**, Szél Á, Fejér Zs, Vigh-Teichmann I. The pineal organ as a folded retina: immunocytochemical localization of opsins. *Biol. Cell.* 1998. 90:653-659.

12. Vigh B., Szél Á., Röhlich P., Görcs T., Saarela S., Hohtola E., **Manzano e Silva M.J.** Comparison of pinopsin immunoreactivity of pineal and retinal photoreceptors. *Med Sci Monit.* 1998. 4, 17-22. ***Impakt: 1,699***

13. **Manzano, M.J.**, Vigh, B. Immunocytochemistry of pinopsin, a green-blue light-sensitive pineal specific opsin. National Symposium on Recent Advances in Pineal Research, February 5-7. Raipur, India. 1999.

14. Fejér Zs. Röhlich P, Szél Á, Dávid CS, Zádori A. **Manzano e Silva MJ**, Vigh B. Comparative ultrastructure and cytochemistry of the avian pineal organ. *Micr Res Techn.* 2001, 53:12-24. ***Impakt: 1,746***

15. Fejér Zs, Haldar C, Ghosh M, Cs. Frank L, Szepessy ZS. Szél Á, **Manzano e Silva MJ**. and Vigh B. Pineal organ-like organization of the retina in megachiropteran bats. *Acta Biol Hung*. 2001. 52:17-27. *Impakt:0,291*
16. Vigh B, **Manzano e Silva MJ**, Rohlich P, Szel A. Comparative fine structural organization and histochemistry of the pineal organ. In: Haldar C, Singaravel, M. and Maitra, S. K. (Eds.) *Treatise on pineal gland and melatonin*. Science Publishers, Enfield, 2001. / Oxford and IBH Publishing Co. New Delhi, 2002. p.17-50
17. Vigh B, **Manzano e Silva MJ**, Zadori A, Frank CL, Lukats A, Röhlich P, Szel A. Nonvisual photoreceptors of the deep brain, pineal organs and retina. *Histol Histopathol* 2002.17:555-590. *Impakt: 2,194*
18. C.L. Frank, C. Dávid, **M.J., Manzano e Silva** and B.Vigh Cerebrospinal Fluid-Contacting Neurons May Convert Nonsynaptic Transmission to Synaptic One and/or To Hormonal Signal Transduction Proceedings of the 21st Conference of European Comparative Endocrinologists, Bonn, August 26-30, 2002. Monduzzi Editore, Bologna. Pp 203-206.
19. Frank, C.L., Dávid, C., Czirok, S., Vincze, C., **Manzano, M.J.**, Vigh, B. Autonomic nerves terminating on smooth muscle cells of vessels in the pineal organ. *Clin. Neurosci.* 56/2, 19. 2003. *Impakt: 1,190*
20. Vigh B, **Manzano e Silva MJ**, Frank CL, David C, Lukats A, Szel A. (2003). Change in the control of the biological circadian rhythms during evolution. The role of the deep brain photoreceptors, pineal organs and retina. In: Csernus V, Mess B (eds) *Rhythmic biological processes. The role of the biological clocks*. Dialog Campus, Budapest, Pécs, p. 43-92.
21. Frank CL, Dávid C, Czirok S, Vincze C, **Manzano e Silva MJ**, Vigh B. Autonomic nerves terminating on smooth muscle cells of vessels in the pineal organ of various mammals. *Acta Biol Hung*, 2003. 54:233-240.
22. Vigh B, **Manzano e Silva MJ**, Frank CS, Takács J, Szabó A, Lukács Á, Szél Á. Fine structural and immunocytochemical comparison between pineal and retinal autonomic nerve endings and efferent fibers. FENS Forum Lisbon July 10-14 2004. Abstracts p. 360.

- 23.** Vigh, B., **Manzano e Silva, M. J.**, Frank, C. L., Vince, C., Czirok, S. J., Szabo, A., Lukats, A. and Szel, A. The system of cerebrospinal fluid contacting neurons. Its supposed role in the nonsynaptic signal transduction of the brain. *Histol Histopathol.* 19, 607-628. 2004.
- 24.** Vigh, B., **Manzano e Silva, M. J.**, Frank, C. L., David, C., Crirok, S. J., Vincze, C., Racz, G., Lukats, A. and Szel, A. The circumventricular organs of the brain: do they represent a cerebrospinal fluid dependent regulatory system? *Med Hypotheses Res.* 1, 77-100. 2004. *Impakt: 1,150*
- 25.** David C, **Manzano e Silva MJ**, Vigh B, Magyar A, Szel A. Blue light-sensitive molecules in the nonvisual photoreceptors regulating diurnal biological periods. Semi-Centennial Conference of Semmelweis University, Faculty of Pharmacy, Smart molecules for therapy Budapest, 12-14. Okt. 2005. Abstr. p. 20.
- 26.** **Manzano e Silva, M.J.**, Vigh, B., David, C., Magyar, A. and Szel, A. Role of the nonvisual photoreceptors in the regulation of diurnal biological periods. *Shiftwork Internat. Newsletter* 22, 103. 2005.
- 27.** **Manzano e Silva MJ**, David C, Magyar A, Vigh B, Szel A. Immunocytochemical localization of short wave-light-sensitive molecules in nonvisual photoreceptors. Can blue-light filtering reduce known pathological effects of night-illumination? 10th Conference of SRBR, Sandestin, May 21-25. 2006. Meeting Abstracts 132, p. 100.
- 28.** David C, Czirok S, Vincze C, Szabo L, **Manzano e Silva MJ**, Vigh B, Szel A. Cerebrospinal fluid-contacting neurons in the mammalian and human central nervous system. IBRO Workshop 26-28 January 2006. Budapest, Clin. Neurosci. Abstr. 18-19.
- 29.** Vigh B, Czirok S, David C, **Manzano e Silva MJ**, Szel A. Cerebrospinal fluid-contacting neurons bearing stereocilia: ultrastructural and immunocytochemical similarity to mechanoreceptors. *European Neuroscience*, Vienna 8-12 July 2006. Abstract Book p.367.
- 30.** Vigh Béla, **Maria Joao Manzano**, Frank Cs. László, Dávid Csaba, Lukács Ákos, Szél Ágoston. Az életritmusokat a környezet megvilágításához igazító fényérzékszervek összehasonlítása gerinces állatokban és emberben. In: Csernus V., Mess B. (szerk): *Biológiai órák. Ritmikus biológiai folyamatok az élővilágban.* Akadémiai Kiadó, pp. 63-

80. 2006.

31. B. Vigh, **M. J. Manzano**, C. David, A. Magyar and A. Szel. The role of short wave-light sensitivity of pineal melatonin secretion in the pathological effects of night-illumination. National symposium on current trends in pineal research. 5-7 October, Raipur India, 2006.

32. Vigh B, *Manzano e Silva MJ*, Magyar A, Szél Á. Filtered, short wave-free light may reduce health risks caused by low pineal melatonin secretion during night illumination. 4th Asia Oceania Conference on Photobiology 24-26 November, Varanasi India Proceedings Supplement, 2008.

33. *Manzano e Silva MJ*. Pineal autonomic nerves of monkey terminating on vessels, their supposed role in melatonin secretion. Magyar Anatomus Társaság XV. Kongresszusa, Budapest 2009. jun. 11-13. Abstr. p. 56.

34. Vigh, B., **Manzano, M. J.**, Vince, C., Magyar, A., Szabo, L., Szel, A. 12th Meeting of the Hungarian Neuroscience Society, 22-24 January, 2009, Budapest, Hungary. Abstract of Papers p. 46.

35. *Manzano e Silva MJ*, David C, Vigh B, Szel A. Pathological effects of night illumination suppressing melatonin secretion. The role of the pineal organ and its autonomic nerves. 26th Conference for chronobiology, Vigo, Spain July 5-9. 2010. Abstract of papers pp.16-17.

36. *Manzano e Silva MJ*, Vigh B, David C, Szel A. Light at night penetrating the skull and reaching the pineal organ in newborn and adult possibly results in pathologic effects by suppressing melatonin secretion. 20th Internat. Symp. on Shiftwork and Working Time. Stockholm, Sweden, June 28- Jul. 1. 2011. Abstract of Papers p. 89.

37. *Manzano e Silva MJ*, Sing R, Haldar Ch, Vigh B, Szél Á. Peripheral autonomic nerves of human pineal organ terminate on vessels, their supposed role in the periodic secretion of pineal melatonin. Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica 2012. 120, 628-634. *Impact: 1,991*

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki Oláh Imre és Szél Ágoston professzoroknak az intézet korábbi és jelenlegi vezetőinek akik mindvégig támogattak munkámban,

Prof. Vigh Bélának , témavezetőmnek,

Röhlich Pál professzornak és Magyar Attila adjunktusnak a dolgozat összeállításában

nyújtott kritikai észrevételeiért és segítségéért,

a laboratóriumban dolgozott néhai Pál Margit asszisztensnőnek aki a hisztotechnikában

nyújtott fontos segítséget,

valamint az intézet összes segítőkész munkatársának.