

IDEGI INTEGRÁCIÓ MECHANIZMUSAINAK KUTATÁSA

S.-RÓZSA KATALIN

Az utóbbi években a membránszinten zajló események vizsgálata mellett előtérbe került a kisszámú neuron együttesek, vagy egyszerű neuron hálózatok strukturális és funkcionális szerveződésének feltárása. Az elemi jelenségek kutatásához viszonyítva a meghatározható számú neuront tartalmazó ideghálózat tanulmányozása komplexebb szintet képvisel, és mintegy átmenetet jelent a sejtszintű neurofiziológiai kutatások és az összetettebb integratív tevékenységre épülő viselkedésvizsgálat között.

Intézetünkben az utóbbi években Molluskákön több olyan készítmény került kifejlesztésre, mely módot ad integratív folyamatok direkt vizsgálatára, s valós neuron-hálózatok szerveződésének leírására.

Gastropoda szívek központi szabályozásának szerveződése

A szív működéssel (és kisebb mértékben a cardio-renális rendszer egészével) kapcsolatban álló neuronhálózat viselkedését elsősorban a szenzoros bemenetek által létrehozott központi változásokkal összefüggésben vizsgáltuk.

A kísérletek *Helix pomatia* L. éber egyedeiből előállított agy-szívideg-szív készítményen folytak [3]. Párhuzamosan regisztráltuk a szív-kontrakciókat, a szívidegi extracellulárisan elvezetett aktivitását és két kiválasztott központi neuron intracelluláris aktivitását (1. ábra). A központi neuronok identifikálása fiziológiai mutatók alapján, valamint CoCl_2 intracelluláris vagy retrográd injektálásával [4] történt. A perifériás receptorok ingerlését főként taktilis ingerrel, máskor 5-hydroxytryptamin intracardiális bevitelével végeztük.

Vizsgálataink során 22 neuront azonosítottunk, melyek kapcsolatban állnak a szív működés szabályozásával. Ezek mindegyike direkt vagy indirekt bemenetet kap a szívből, de a szív működését csak egy részük módosítja. A szív szabályozását végző neuronok szórtan helyezkednek el a viscerális és jobb parietális ganglionban (2. ábra). *Helix pomatia* központi idegrendszerében azonosított neuronhálózat nemcsak a szív, hanem a cardio-renális rendszer egészének szabályozását is végzi [1].

A cardio-renális rendszer szabályozását végző 22 neuron között szenzoros, motoros és interneuronokat találtunk. A szenzoros és motoneuronok identifikálása a szóma kisüléssel korreláló, szívidegről elvezethető jelek segít-

ségével történt, majd a sejtek axonjának szívidegbe haladása CoCl_2 intracelluláris bevitelével nyert bizonyítást [5]. A szenzoros sejtek többsége bipoláris, gazdag elágazással míg a motoneuronok unipolárisak, az interneuronok pedig többnyire pseudo-unipolárisak (3. ábra), a ganglionban végződő arborizációval.

A szív taktilis és kémiai ingerlésére reagáló sejtek válasza spontán aktív sejteken gátlás, aktivitásfokozódás vagy kettős hatás volt. A sejtek gátlása és serkentése az esetek többségében gátló (GPSP) vagy serkentő (SPSP) poszt-szinaptikus potenciálok közbeiktatásával történt. A poszt-szinaptikus potenciálokat nem generáló sejtek többnyire elsődleges érző neuronnak felelnek meg, hallgatólag sejtek a szív ingerlésre szinaptikus jelekkel és AP generálással válaszoltak.

Az identifikált, szívműködés szabályozásában részt vevő neuronok többsége egyaránt reagált a szív taktilis és kémiai ingerlésére. Taktilis ingerre 9 sejt aktivitásfokozódással és egy kettős reakcióval válaszolt. Kémiai inger 7 sejten aktivitásfokozódást, 6 sejten gátlást és 3 sejten kettős választ hozott létre. Sejtek egy része eltérő választ adott, taktilis, illetve kémiai ingerlésre.

A szóma kisülése a szívidegen korreláló jel formájában az RPa1, RPa5, V12, V13, V14 és V21 neuronok esetén azonosítható. E sejtek közül a V12 és V13 szívműködést gátló motoneuronok, intestinális idegbe futó axonnal.

A motoneuronok mellett több bemenettel kapcsolatban álló jellegzetes aktivitási mintázattal rendelkező interneuronokat is azonosítottunk, melyek nemcsak a szív receptor zónáiból érkező információ hatására módosítják működésüket, hanem a pericardium, vese, máj és véredények ingerlésére is reagálnak. E sejtek közül a V21 neuron a legtipikusabb, mely egyben a szívet szabályozó neuronhálózat központi eleme. A V21 fázisos vagy tónusos mintázattal rendelkezik, mely szoros kapcsolatban áll a szívműködéssel (4. ábra). E sejt fázisos működése burst-szerű rendezettségben jelentkezik, és a kisüléscsoport egybeesik a szívkontrakcióval. A V21 neuron működése a szív, pericardium és vese ingerlésekor egyaránt tónusossá válik (4. ábra, A, B, C), a folyamatos üzemmód pedig fény hatására ismét burstszerű lesz (4. ábra, D). A V21 sejt tónusos kisülése minden esetben gátolja a szívműködést, függetlenül attól, hogy melyik bemenet aktiválásának eredményeként lépett fel.

V21-hez hasonlóan fázisos vagy tónusos kisüléseket mutatott az RPa1 (Br-sejt) is. Az RPa1 sejt burst kisülései is tónusossá váltak a szív ingerlésekor, ez azonban a szív-ritmust nem befolyásolta.

A szabályozó hálózat elemeinek efferens hatását a sejtek hiper-, illetve depolarizálásával szimuláltuk. Vizsgálataink szerint csak a moto- és interneuronok depolarizálása modulálja a szívműködést. A vizsgált sejtek között 6 motoneuron és 3 interneuron hatástípusát írtuk le.

A szívműködés szabályozását végző sejtek közötti kapcsolat és az alávagy fölérendeltségi viszony tisztázására a központi neuronok kapcsolási típusát, valamint kölcsönhatását is vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a V21 sejt számos sejttel szinaptizál a viscerális ganglionon belül. A sejtek egy részéhez SPSP-eket, másokhoz GPSP-eket továbbít. A V21 követő sejtjein a poszt-szinaptikus potenciálok a tónusos kisülés idején jelennek meg. Az egyik sejten, amelyhez a V21 SPSP-eket küld, az aktivitás foka függ az aktivált bemenet jellegétől, így a vese és a véna ingerlése intenzív AP generálást indít, de a szív és aorta ingerlése csak SPSP megszaporodást okoz.

Gátló poszt-szinaptikus potenciálokat is számos sejt kap a V21-től, többek között a V22 sejt is. A V22 sejtnek van egy szimmetrikusan szervezett

sejtpárja is. E két sejt a szív, vese és véna ingerlésekor nagy GPSP-k részvételével gátlódik, de az aorta ingerlésére nem reagál (5. ábra). E két sejten a GPSP-k és a kisülés gátlása a V21 neuron tónusos tüzelése alatt lép fel. A két követő sejt egymással nincs direkt kapcsolatban, egyik sejt membránjának polarizálása sem befolyásolja a másik működését, a V21 sejt viszont mindkettő kisülését azonos módon változtatja meg. Ez azt mutatja, hogy e két sejt működését a vezér elem szinkronizálja. Egy másik sejtpáron a V21 tónusos működésekor frekvenciafokozódás lép fel. E szimmetrikus működésű sejtpáros egymással elektromosan kapcsolt, axo-axonális szinapszison át (3. ábra, D).

A szimmetrikusan szervezett sejtpárosok mellett olyan sejtpárokat is találtunk, melyek egyidejű rövid lefutású frekvenciafokozódással reagálnak a cardio-renális rendszer különböző tagjainak ingerlésére, bár eredeti aktivitási mintázatuk eltérő. Az aorta és a pitvar ingerlésekor mindkét sejten burst-szerű aktiválás figyelhető meg, melyet némi késéssel a szív működés gátlása követ. A kamra, véna, máj, vese ingerlésére ez a fajta aktivitás nem lép fel [2].

Az adatok igazolták, hogy más-más sejtpáros szállítja az információt a cardio-renális rendszer különböző tagjaitól a hálózat központi elemét alkotó V21 interneuronhoz, melyen már csak uniformizált válasz figyelhető meg.

Eredményeink szerint a ganglionáris idegrendszerben is hierarchikus rendezettségű az egyes szerveket vagy szervrendszereket szabályozó neuron-populáció. Ez azonban funkcionálisan szervezett hierarchiát jelent, esetenként a morfológiai hierarchia azonosítási lehetősége nélkül. A hierarchikus felépítést hangsúlyozza a szenzoros, a moto- és interneuronok jelenléte az identifikált neuron-populációban, valamint a bemenetek több szinten való azonosíthatósága.

Eredményeink szerint a hálózat központi elemeinek szintjén, vagyis az interneuronok aktivitási mintázatában már nem különíthető el a bemenet eredete, mivel pl. a V21 sejten a cardio-renális rendszer bármely tagjának ingerületbejutása folyamatossá teszi a burst-szerű kisülést, s ennek eredménye minden esetben a szív gátlása. A bemenet eredete azonban a hálózat közti elemein elkülöníthető, mert ezek a különböző perifériás mezők (aorta vagy véna, pitvar vagy kamra) bemeneteinek felvételére specializálódtak. A hálózat ezen elemeinek viselkedése lehetőséget nyújt a neuronhálózat sub-rendszerekre való osztására. Megállapítottuk, hogy a sub-rendszerek meghatározott receptor mezőkről érkező információk gyűjtő állomásai, egymással direkt kapcsolatot nem alkotnak, működésüket a hálózat vezérelemei (interneuronok) koordinálják. A szív működést szabályozó neuronhálózatban az információ-továbbítás parallel huzalozású pályákon történik, melyek felváltva vagy eltérő kombinációkban működve biztonságosabbá teszik a vezérelemek állandó informálását. A vezérelemek (pl. V21) hatásukat motoneuronokban (pl. V12, V13) keresztül érvényesíthetik, s rendszerint ezek az efferens pályák is kettőztek.

A cardio-renális rendszert, ezen belül a szív működést szabályozó neuronhálózat a túlbiztosított, konvergáló típusú hálózatok csoportjába sorolható.

Kémiai ingerek perifériás és központi megkülönböztetése éticsgán (*Helix pomatia* L.)

Az állat viselkedését döntően befolyásolják a táplálékszerzéssel kapcsolatos folyamatok. Ezek megvalósulásában a csiga száj- és ajakkörüli receptorai fontos szerephez jutnak. A kemoreceptorok vizsgálatára agy-szájszerv készítményt dolgoztunk ki, mely a garatkörüli gangliongyűrűt, a szájszervet és a kettőt összekötő idegeket tartalmazta [8]. E készítményen vizsgálni lehetett az ajak kémiai receptorainak természetét, valamint a kemoreceptorok indukálta változásokat a központi idegrendszer egyes sejtjein. A kísérletek során a n. intestinalis aktivitását extracellulárisan, a központi neuronok aktivitását intracellulárisan, üveg mikroelektrodákkal vezettük el. Az ingeranyagokat a szájszervre applikáltuk (6. ábra).

Megállapítottuk, hogy a száj körüli receptorok kémiai érzékenysége a különböző anyagokra eltérő. A KCl általános depolarizáló tulajdonsága révén hat, de a NaCl, glukóz, szacharóz és desztillált víz szelektív kemoreceptor izgatók [9]. Az eredmények igazolták, hogy a receptorok kemoérzékenysége specifikus, és a periférián íz-diszkrimináció történik.

A cerebrális, parietális, pleurális és viscerális ganglionokban egyaránt találtunk a száj körüli receptorok kémiai ingerlésére reagáló központi neuront. E neuronok más-más bemenetet kapnak a különböző kémiai ingerekre az érző mezőből, és a neuronválaszok is eltérőek. Az eltérő válaszok summációs folyamatok eredményeként alakulnak ki. A viscerális és parietális ganglion az ajakidegtől távolabb helyezkedik el, és itt a poliszinaptikus kapcsolatok dominálnak a neuronok válaszában.

A különböző neuronok közül egyesek minden anyagra azonos módon reagáltak, míg mások az eltérő anyagokra eltérő választ adtak (7. ábra). Az ajakreceptorok ingerlésekor szinaptikus aktiválódás vagy gátlás, illetve a központi neuron membrán potenciáljának változása volt megfigyelhető. Eredményeink szerint a különböző kémiai ingerek eltérő neuronpályákat aktiválnak, és az íz-diszkrimináció a központi idegrendszerben neuron-szinten is végbemegy. Az íz-diszkrimináció folyamatában résztvevő központi neuronok között másodlagos érző sejtek, moto- és interneuronok vannak. A receptorokból a központi neuronokig mono- vagy poliszinaptikus pályán jut el az ingerület, s más szervekből érkező információval keveredve vezet adekvát viselkedésválaszhoz.

Axonpályák vizsgálata *Lymnaea stagnalis* L. központi idegrendszerében

Lymnaea stagnalis izolált központi idegrendszerében 15 neuront azonosítottunk aktivitási mintázatuk alapján. E sejtek axonpályáinak lefutását CoCl_2 intracelluláris injektálásával, illetve retrográd festéssel vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a neuronok többsége pseudounipoláris, s ezek elágazó axonok segítségével két, esetenként három ganglion között létesítenek összeköttetést. A neuronok be- és kimeneti jellemzőit elektrofiziológiai mérésekkel vizsgáltuk. A szómából regisztráltuk a spontán aktivitást, és vizsgáltuk annak összefüggését az idegekről szívóelektrodával elvezetett extracelluláris jelekkel, másrészt

az idegek ingerlésével kiváltott antidromos és ortodromos válaszokat tanulmányoztuk [6, 7].

A vizsgált axonpályák többsége az intestinális és jobb pallialis idegbe fut ki, de vannak neuronok, amelyek két idegbe is küldenek axont. Más neuronok axonjai nem lépnek ki a ganglionokból (8. ábra).

Az identifikált neuronokat funkcionális szerepüknek megfelelően három csoportba soroltuk:

1. egyszerű, illetve integratív funkciót is betöltő motoneuronok;
2. szenzoros neuronok (elsődleges vagy másodlagos);
3. közvetlen perifériás kimenettel nem rendelkező neuronok, melyek az interganglionáris integratív folyamatokban játszanak szerepet.

Lymnaea központi idegrendszerében e sejtpárokból történt parallel elvezetéssel mind ez ideig nem sikerült közvetlen módon interneuronokat azonosítani, azonban az egyes neuronok bemeneti, illetve kimeneti mintázatának tanulmányozása során arra lehetett következtetni, hogy az óriás neuronokon több serkentő és gátló interneuron hatása konvergál. Különösen a vizsgált idegekbe közvetlen axont nem küldő, feltételezhetően integratív funkciójú neuronok rendelkeznek igen gazdag szinaptikus bemenettel.

Néhány sejtpár esetében mind a CoCl_2 festéssel, mind elektrofiziológiai mérésekkel igazoltuk azok elektrotónusos kapcsolatát. Ezek a sejtek szinkron működést mutatnak, és kölcsönösen befolyásolni képesek egymás aktivitását. Szerepük *Lymnaea* fiziológiai működésének szabályozásában még nem tisztázott.

STUDIES ON THE MECHANISM OF THE NEURAL INTEGRATION

KATALIN S.-RÓZSA

Recently, in addition to the investigation of the membrane events at cellular level, the exposure of the structural and functional organization of simple neural nets or ensembles came into the foreground. In comparison with elementary membrane processes, the investigation of the neuronal network of a given number of cells represents a more complex level of research and creates a transition from neurophysiological investigations on the cellular level to behavioural studies of integrative functions.

In our Institute during the past years several preparations were developed on molluscs for experimental studies of integrative processes and for the determination of the organization of real neuronal networks.

Organization of the central regulation of Gastropoda hearts

The neuronal network regulating the heart beat with special reference to central reactions arising in answer to the sensory inputs originating from the heart and to a lesser degree from the whole cardio-renal system was analyzed.

The investigations were carried out on the brain-heart preparation of the active snail, *Helix pomatia* L. [3]. The heart contractions, the extracellular

activity of the heart nerve and the intracellular activity of two central neurones were registered simultaneously (*Fig. 1*). Identification of the central neurones was made according to the reaction in response to the heart stimulation and that of the intracellular or retrograde injection of CoCl_2 [4]. The stimulation of peripheral receptors was performed mainly by tactile stimuli or with intracardial perfusion of 5-hydroxytryptamine.

As a result of our investigations 22 neurones involved in heart regulation have been identified. All of them received direct or indirect inputs from the heart, nevertheless, only some modified the activity of the heart. The neurones taking part in the regulation of the heart are scattered throughout the visceral and right parietal ganglia (*Fig. 2*). The neural network identified in the central nervous system of *Helix pomatia* regulates both the heart activity and the whole cardio-renal system [1].

Among the neurones, regulating the heart beat and the cardio-renal system sensory neurones, motoneurones and interneurones were found. The sensory and motoneurones were identified according to the correlation of the soma spike with one component of the extracellular activity of the cardiac nerve, further the running of the axons towards the heart was proved by intracellular CoCl_2 staining [5]. The majority of the sensory cells proved to be bipolar displaying rich arborization, while the motoneurones were unipolar and the interneurones had pseudo-unipolar axons terminating within the ganglia (*Fig. 3*).

On the spontaneously active cells the reaction of the cells to the tactile or chemical stimulation of the heart was either inhibition, or increase in the activity, while in some cases biphasic effect occurred. In the majority of the cells inhibition or excitation was due to the generation of inhibitory or excitatory postsynaptic potentials (IPSP or EPSP). The neurones failing to generate postsynaptic potentials were mainly primary sensory cells. Upon the stimulation of the heart the silent cells produced synaptic or action potentials.

Most of the identified cells regulating heart beat reacted to both tactile and chemical stimulation of the heart. Upon tactile stimulation the activity of 9 cells was increased, 12 cells were inhibited and one cell showed biphasic reaction. Chemical stimulation of the heart caused increase in activity on 7 cells, decrease in activity on 6 cells and biphasic response on 3 cells. Several cells responded antagonistically to tactile then to chemical stimuli.

The discharge of the soma was found to correlate with one component of the electrical activity of the heart nerve in RPa1, RPa5, V12, V13, V14 and V21 neurones. Among them V12 and V13 proved to be inhibitory motoneurones of the heart, giving branches into the intestinal nerve.

Together with motoneurones also interneurones were identified showing characteristic pattern of activity and being connected not only with the receptor area of the heart but with the pericardium, blood vessels, kidney and liver, too. Among them, neurone V21 proved to be the most typical, playing at the same time central role at the neuronal network regulating the heart. The pattern of neurone V21 was either tonic or phasic, showing close correlation with heart beat (*Fig. 4*). The phasic pattern of cell V21 appeared as a burst coinciding with heart contractions. The phasic pattern of cell V21 became tonic upon the stimulation of the heart, pericardium and kidney (*Fig. 4A, B, C*), while the tonic pattern turned again to phasic under the influence of illumination (*Fig. 4D*). The tonic pattern of cell V21 always resulted in the

inhibition of heart activity independently from the nature of activated inputs leading to tonic discharges.

Similarly to cell V21 burst activity was found on cell RPa1 (Br cell). The burst activity of cell RPa1 was also turned to tonic pattern during heart stimulation, however, the latter failed to influence heart rhythm.

The efferent influence of the regulating network was tested by hyper- or depolarization of the cells. According to our results the depolarization or hyperpolarization only of moto-, and interneurons modified the heart beat. Among identified neurons the effect of six motoneurons and three interneurons was described.

The interconnections and relationship between central neurons taking part in heart regulation were also studied and an attempt was made to clear up the role of each neuron in the network. Neuron V21 was found to be in contact with numerous cells within the visceral ganglion. Some of the cells receive EPSP-s, while the other ones IPSP-s from neuron V21. On the follower cells of V21 the postsynaptic potentials appear during the tonic firing of V21. On one cell receiving EPSP from V21 the degree of the activation depended on the nature of the activated inputs, e.g. the stimulation of the vein and kidney evoked an intensive generation of action potentials, while the stimulation of the heart and aorta caused only increase in the frequency of EPSP-s.

Among others, cell V22 receives also IPSP-s from neuron V21. Cell V22 has a symmetrically organized partner cell. These two cells were inhibited by large IPSP-s during the stimulation of the heart, kidney and vein, however, the stimulation of the aorta was without effect (*Fig. 5*). On both cells, IPSP-s and the inhibition of discharge appeared during the tonic firing of neuron V21. No direct connection was found between the two cells as the polarization of the membrane of either cell was without effect on the other cell, however, cell V21 influenced in a similar manner the firing of both cells. This shows that the firing of these two cells is synchronized by a command element. On an other pair of the cells increase in frequency was observed during the tonic firing of neuron V21. This pair of cells discharging synchronously coupled electrically through an axo-axonal synapse (*Fig. 3D*).

Beside the symmetrically organized pair of cells also two neurons were found reacting with simultaneous short increase in frequency to the stimulation of different area of the cardio-renal system, although their original pattern of activity differed. On both cells burst activity appeared upon the stimulation of the aorta and auricle causing with some delay the inhibition of the heart beat. This type of activity was not observed during the stimulation of the ventricle, vein, liver and kidney [2].

The data proved that different pairs of the cells transmit the information from various areas of the cardio-renal system to the central member of the network, e.g. neuron V21, where only uniformized reaction can be observed.

According to our data in the ganglionic nerve system the neuron ensemble regulating various organs or system of the organs is built up also in a hierarchical manner. However, it represents only a functional hierarchy without a morphologically organized hierarchy. The hierarchical character of the system was emphasized by the presence of sensory, moto-, and interneurons, among the identified cells, as well as by the detection of the activation of inputs on various levels.

According to our data at the level of the central elements of the network, e.g. in the activity pattern of the interneurone, the origin of the inputs is no longer distinguishable. For example, in cell V21 the activation of various parts of the cardio-renal system caused the turning of burst activity into a tonic one resulting always in the inhibition of the heart. On the middle level of the network the origin of the inputs can be verified as this part is specialized for receiving the inputs from various peripheral areas (aorta or vein, auricle or ventricle). The behaviour of the middle level of the network gives possibility for dividing the neural network into subsystems. It was found that the subsystems can be regarded as collectors of information, running from certain receptor fields, forming no direct connections with each others and being coordinated by a command element (interneurones) of the network. In the network regulating heart beat the transmission of the information takes place in parallel pathways, assuring the permanent information of command elements by alternative or combinative functioning. The command elements (e.g. V21) can realize their effect by motoneurones (e.g. V12, V13) too, and as a rule these efferent pathways are also doubled.

The network regulating heart activity and the whole cardio-renal system belongs to the overguaranteed, convergent networks.

Peripheral and central discrimination of chemical stimuli in the snail (*Helix pomatia* L.)

The behaviour of the animal is basically affected by processes connected with the obtaining of the food. For realizing these behavioural acts the receptors in the area of the mouth and lips are of vital importance. For studying the chemoreceptors brain-lip preparation was made containing suboesophageal ganglionic ring, mouth and the nerve coupled the two systems [8]. This preparation gave possibility to study the nature of chemoreceptors of the lips, as well as the changes of activity of single cells in the central nervous system as a response to chemoreceptor stimulation. During the experiment the activity of the labial nerve was registered extracellularly, while the activity of central neurones was registered intracellularly by glass microelectrodes. The substances were applied to the surface of the mouth (*Fig. 6*).

The chemosensitivity of the receptors in the area of the mouth was found to be different to the various substances. KCl had an effect due to its common depolarizing nature, however NaCl, glucose, saccharose and distilled water can be regarded as specific stimuli of chemoreceptors [9]. The results proved the specificity of the chemosensitivity of the receptors and the discrimination of the taste at the periphery.

In the cerebral, parietal, pleural and visceral ganglia alike there were found neurones reacting to the stimulation of the receptors of the mouth. These neurones received various inputs when different chemostimuli were applied to the sensory area and the answer of the neurones also significantly differed. Various responses were formed as a result of summation. In the visceral and parietal ganglia situating farther from the labial nerve the polysynaptic influences determine the reaction of the neurones.

Some of the neurones reacted uniformly others showed specific answer to different substances (*Fig. 7*). As an answer to the stimulation of chemo-

receptors of the mouth synaptical inhibition and activation or changes in membrane potential of the central neurones were observed. According to our results various neural pathways are activated by different chemical stimuli and the discrimination of taste takes place on the neuronal level of the central nervous system, too. Among the central neurones taking part in the discrimination of taste, secondary sensory cells, moto- and interneurones were found. The excitation is forwarded by mono- or polysynaptic pathways from the receptors to the central neurones, where combining with the information arriving from other organs, the taste discriminating process results in the required change of behaviour.

Studies on the axonal pathways in the central nervous system of *Lymnaea stagnalis* L.

In the central nervous system of *Lymnaea stagnalis* 15 neurones were identified on the basis of their pattern of activity. The running of the axonal pathways was studied with retrograde or intracellular injections of CoCl_2 . The majority of the neurones was found to be pseudounipolar, creating contact with branching axons between two or three ganglia. The inputs and outputs of the neurones were studied by electrophysiological measurements. The spontaneous activity was registered from the soma and was compared to the extracellular activity of the nerves registered with suction electrodes; on the other hand, the antidrom and orthodrom reactions evoked by stimulation of the nerves were also studied [6, 7].

The majority of the investigated axonal pathways was directed to the intestinal and right pallial nerves, though, some of the neurones sent an axon into two nerves. Axons of other neurones did not leave the ganglia (*Fig. 8*).

The identified neurones can be divided into three groups according to their functional role:

1. usual motoneurones, sometimes with integrative function;
2. sensory neurones (primary or secondary);
3. neurones having no direct peripheral outputs, and playing role in the interganglionic integrative processes.

Using simultaneous registration from two central neurones of *Lymnaea* the interneurones were not yet directly identified, however, the convergence of several excitatory and inhibitory interneurones on the giant neurones was proved according to the pattern of inputs and outputs. Especially the neurones of proposed integrative functions, sending no axons to the nerves, are provided with rich synaptic inputs.

For several pairs of neurones both the staining with CoCl_2 and the electrophysiological measurements proved the electrotonic coupling. These cells discharge synchronously and are able to effect each other's activity. Their role in the regulation of the physiological processes in *Lymnaea* has not been cleared up.

ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ НЕРВНОЙ ИНТЕГРАЦИИ

КАТАЛИН Ш.-РОЖА

В последние годы помимо изучения элементарных свойств нейронов на первый план были выдвинуты исследования нейронных сетей, построенных из определенного числа нейронов. По сравнению с изучением элементарных свойств нейронов, исследование нейронных ансамблей с известными регуляторными функциями представляет более сложный уровень организации и в определенной мере создает переход от клеточной нейрофизиологии к изучению интегративной деятельности и поведения.

В настоящее время в нашем Институте были разработаны специальные препараты из моллюсков, позволяющие осуществить непосредственные исследования интегративных процессов и описание реальных нейронных сетей.

Центральная организация регуляции сердца брюхоногих

Поведение нейронной сети, регулирующей работу сердца, (и в меньшей мере всей кардио-ренальной системы), было изучено на основании изменений, наступающих в центре в ответ на активацию сенсорных входов.

Эксперименты были проведены на препарате, содержащем сердце, сердечный (интестинальный) нерв и окологлоточные ганглии, приготовленном из бодрствующих виноградных улиток (*Helix pomatia*, L.) [3].

Одновременно были зарегистрированы сокращения сердца, внеклеточная активность сердечного нерва и внутриклеточная активность двух выбранных центральных нейронов (Рис. 1). Центральные нейроны были идентифицированы согласно их физиологическим характеристикам, потом клетки были покрашены ретроградным или внутриклеточным введением CoCl_2 [4]. Раздражение периферических рецепторов осуществлялось главным образом тактильным раздражителем, иногда 5-гидрокситриптамиин (5-НТ) вводился интракардиально.

В ходе исследований были идентифицированы 22 нейрона, участвующие в регуляции сердечной деятельности. Все они получали входы от сердца, но работа сердца изменялась только под влиянием некоторых из них. Нейроны, регулирующие сердечный ритм, расположены диффузно в висцеральном и правом париетальном ганглиях (Рис. 2). Нейронная сеть, идентифицированная в центральной нервной системе виноградной улитки, регулирует не только сердечную деятельность, но и целую кардио-ренальную систему [1].

Среди 22 клеток, вовлеченных в регуляцию сердечной деятельности, были определены сенсорные клетки, мотонейроны и интернейроны. Сенсорные клетки и мотонейроны были идентифицированы на основании корреляции потенциала действия сомы и одного компонента внеклеточной активности сердечного нерва, дальнейшее участие их аксонов в составе интестинального нерва было доказано внутриклеточным введением CoCl_2 [5]. Сенсорные клетки оказались биполярными с большим количеством разветвлений, мотонейроны были униполярными, а интернейроны — псевдоуниполярными, заканчивающимися в ганглии арборизациями (Рис. 3).

Реакция спонтанно активных клеток, отвечающих на тактильное и химическое раздражение сердца, выражалась в угнетении или увеличении

разряда, или же в двухфазном изменении. Торможение и возбуждение клеток в большинстве случаев осуществлялось с участием тормозных или возбуждающих постсинаптических потенциалов (ТПСП, ВПСП). Нейроны, не генерирующие постсинаптические потенциалы, являются обычно первичными сенсорными клетками. Молчащие клетки отвечают на раздражение сердца синаптическими потенциалами или генерацией потенциала действия.

Большинство клеток, связанных с регуляцией сердечной деятельности, реагировало и на тактильное, и на химическое раздражение сердца. Применяя тактильное раздражение, было установлено, что активность 9 клеток увеличилась, 12 — уменьшилась и 1 клетка показала двухфазный ответ. Химическое раздражение вызывало увеличение активности 7 клеток, угнетение активности 6 клеток и на 3 клетках наблюдалась двухфазная реакция. Часть клеток дала противоположный ответ на тактильное и химическое раздражения.

Потенциалы действия сомы клеток можно обнаружить по синхронной активности сердечного нерва в следующих случаях: RPa1, RPa5, V12, V13, V14 и V21 нейроны. Из них клетки V12 и V13 оказались тормозными мотонейронами сердца, посылающими аксоны в интестинальный нерв.

Помимо мотонейронов были идентифицированы интернейроны, которые связаны с многочисленными входами и обладают характерным типом активности, реагируя не только на информацию, приходящую от рецепторных зон сердца, но и на раздражение перикарда, почки, печени и кровеносных сосудов. Среди интернейронов клетка V21 оказалась самой типичной, являясь одновременно центральным элементом нейронной сети, регулирующей сердечную деятельность. Тип активности нейрона V21 или фазный, или тонический, находящийся в тесной взаимосвязи с работой сердца (Рис. 4). Когда клетка работает в фазном режиме, она обладает залповой активностью и эта группа потенциалов действия совпадает во времени с одиночными сокращениями сердца. Фазный разряд клетки становится тоническим в ответ на раздражение сердца, перикарда и почки (Рис. 4 А, В, С), а тонический тип активности всегда превращается снова в залповый при освещении ганглиев (Рис. 4D). Тонический тип активности клетки V21 всегда влечет за собой торможение сердечной деятельности, независимо от того, каким входом он был вызван.

Подобно клетке V21 нейрон RPa1 тоже обладает залповой или тонической активностью. Залповая активность клетки RPa1 тоже становится тонической во время раздражения сердца, но это не видоизменяет работу сердца.

Эфферентное воздействие элементов регулирующей сети было воспроизведено гипер-, или деполяризацией клеток. Согласно нашим данным деполяризация или гиперполяризация только мото- и интернейронов модулировали сердечную деятельность. Среди исследованных клеток был изучен эффект 6 мотонейронов и 3 интернейронов.

Были также выяснены типы связей и взаимоотношений центральных нейронов, регулирующих сердечную деятельность. Установлено, что клетка V21 создает синаптические связи со многими нейронами висцерального ганглия. Одни клетки получают ВПСП, а другие ТПСП от V21. На подчиненных клетке V21 нейронах постсинаптические потенциалы появились во время тонических разрядов клетки V21. На одной клетке, получающей ВПСП от нейрона V21, степень активации зависит от природы возбужденных входов

так, что раздражение почки и вены вызывает интенсивную генерацию потенциалов действия, но раздражение сердца и аорты приводит только к увеличению частоты ВПСП.

Многие клетки, в том числе и V22, получают тормозные постсинаптические потенциалы от нейрона V21. Клетка V22 обладает одной симметрично организованной партнерной клеткой. При раздражении вены и почки эти две клетки были заторможены с участием больших ТПСП, но раздражение аорты не вызывало никакой реакции (Рис. 5). Возникновение ТПСП и торможение этих двух клеток наступало тоже во время тонического разряда нейрона V21. Эти две клетки не связаны между собой, так как поляризация мембраны любой из них не вызывает изменения активности другой, но клетка V21 видоизменяет деятельность обеих одинаковым образом. Это указывает на то, что разряды этих двух клеток синхронизируются командным элементом. На другой паре клеток было обнаружено учащение ритма во время тонического типа активности клетки V21. Другие пары нейронов, организованные для симметричной работы, создают между собой электрические связи через аксоксонные синапсы (Рис. 3D).

Помимо симметрично организованных клеток были обнаружены другие пары, которые реагировали кратковременным увеличением частоты разрядов в ответ на раздражение различных участков кардио-ренальной системы, хотя их исходная активность была различной. При раздражении аорты и предсердия на обеих клетках появились залповые импульсы, вызывающие с некоторой задержкой торможение сердечной деятельности. Подобная реакция наступала при раздражении желудочка, вены, печени и почки [2].

Данные подтвердили, что различные пары нейронов передают информацию из различных участков кардио-ренальной системы к центральному звену сети, т. е. к нейрону V21, где наблюдается только униформированный ответ.

Согласно нашим данным в ганглионарной нервной системе нейронная сеть, регулирующая разные органы, организована тоже иерархическим образом. Однако это означает только функциональную иерархию без строгой морфологической последовательности. Иерархическое устройство подтверждается наличием сенсорных, моторных и промежуточных нейронов в идентифицированной нейронной популяции, а также тем фактом, что активацию входов можно проследить на разных уровнях системы.

Как показали наши исследования на уровне центральных элементов, т. е. в паттерне интернейронов уже нельзя различить источник активации входов, т. к. залповая активность нейрона V21 становится тонической при раздражении любого участка кардиоренальной системы, приводящей одновременно к торможению сердца. Однако участок активации входов достоверно различается на промежуточных звеньях системы, так как они специализированы для приема информации из различных периферических полей (аорта или вена, желудочек или предсердие). Поведение промежуточных элементов системы дает возможность деления нейронной сети на суб-системы. Было установлено, что суб-системы являются приемными станциями информации, поступающей из определенных рецепторных областей, они не создают прямой связи друг с другом, и их деятельность координируется командными элементами (интернейронами) сети. В нейронной сети, регулирующей сердечную деятельность, проведение информации происходит по параллельно организованным путям, которые, работая по очереди или в разных

комбинациях, делают более достоверной непрерывную информацию командных элементов. Обычно командные элементы (V21) осуществляют свои воздействия посредством мотонейронов (V12, V13), и эти эфферентные пути, как правило, тоже удвоены.

Нейронная сеть, регулирующая сердечную деятельность и всю кардиоренальную систему, принадлежит к сверхгарантированным, конвергирующим сетям.

Центральная и периферическая дискриминация вкуса на виноградной улитке (*Helix pomatia* L.)

Процессы, связанные с добыванием пищи, влияют решающим образом на поведение животного. В осуществлении добывания пищи важную роль играют рецепторы губной и ротовой областей. Для изучения хеморецепторов был разработан препарат, содержащий окологлоточные ганглии, ротовой орган и связывающий их нерв [8]. На этом препарате можно было изучить природу хеморецепторов губы и изменения на уровне одиночных нейронов центральной нервной системы, наступающие в ответ на раздражение хеморецепторов. В ходе экспериментов активность губного нерва регистрировалась внеклеточно, а активность центральных нейронов отводилась внутриклеточно стеклянными микроэлектродами. Возбуждающие вещества были апплицированы к ротовой области (Рис. 6).

Было установлено, что химическая чувствительность рецепторов ротовой области к разным веществам различная. KCl оказывает влияние, благодаря своим общим деполяризующим свойствам, но NaCl, глюкоза, сахара и дистиллированная вода являются специфическими раздражителями хеморецепторов [9]. Результаты исследований показали, что хемочувствительность рецепторов является специфической и дискриминация вкуса происходит уже на периферии.

Во всех; церебральных, париетальных, плевральных и висцеральных ганглиях были обнаружены нейроны, реагирующие на химическое раздражение рецепторов ротовой области. Эти нейроны получают разные входы из сенсорных областей в ответ на разные химические раздражители и их ответная реакция тоже разная. Разные реакции формируются в результате суммарных процессов. Висцеральный и париетальный ганглии удалены от ротового нерва, и здесь в реакции нейронов доминируют полисинаптические связи.

Среди нейронов одни реагировали одинаковым образом на все вещества, а другие показывали разные ответы на различные вещества (Рис. 7). Во время раздражения рецепторов ротовой области были обнаружены синаптическое возбуждение и торможение, или же изменение мембранного потенциала центральных нейронов.

Согласно нашим данным разные химические раздражители активируют разные нейронные пути и дискриминация вкуса происходит и на уровне нейронов центральной нервной системы. Среди нейронов, участвующих в дискриминации вкуса, были идентифицированы вторичные сенсорные клетки, мотонейроны и интернейроны. Возбуждение проходило через моно- и полисинаптические пути с рецепторов к центральным нейронам, где, смешиваясь с информацией, поступающей из других органов, приводило к адекватным изменениям поведения.

Изучения аксонных путей в центральной нервной системе прудовика, *Lymnaea stagnalis* L.

В изолированной центральной нервной системе *Lymnaea stagnalis* L. 15 нейронов были идентифицированы согласно типам их активности. Проекция аксонных путей этих нейронов была изучена ретроградным или внутриклеточным введением CoCl_2 .

Большинство нейронов оказалось псевдоуниполярными, создающими при помощи разветвляющихся аксонов связь между двумя, иногда тремя ганглиями. Характеристики входов и выходов нейронов были изучены электрофизиологическими измерениями. Спонтанная активность была зарегистрирована на some и сопоставлена с одной стороны с внеклеточными потенциалами нервных волокон, зарегистрированных при помощи всасывающих электродов, и с другой стороны — антидромными и ортодромными ответами, вызванными раздражением разных нервов [6, 7].

Большинство изученных аксонных путей было направлено в интестинальный и правый паллиальный нервы, но некоторые нейроны посылали аксоны в два нерва одновременно. Аксоны других нейронов не выходили из ганглиев (Рис. 8).

Идентифицированные нейроны по их физиологическим функциям разделяются на три группы:

1. простые мотонейроны, играющие иногда роль в интеграции,
2. сенсорные нейроны (первичные или вторичные),
3. нейроны, не обладающие прямыми выходами на периферию и играющие роль в интерганглионарных интегративных процессах.

В центральной нервной системе *Lymnaea stagnalis* L. одновременным отведением от пары клеток пока не удалось идентифицировать интернейроны, однако в ходе изучения паттерна входов и выходов отдельных нейронов можно было предположить, что на гигантские нейроны конвергируют многие возбуждающие и тормозные воздействия интернейронов. Синаптическими входами особенно богаты нейроны, не посылающие аксоны в исследуемые нервы и обладающие интегративными функциями.

Электрофизиологические измерения нескольких пар клеток и окрашивание с CoCl_2 подтвердили наличие электротонических связей. Установлено, что эти клетки работают синхронно и способны взаимно видоизменять друг друга, однако их роль в регуляции физиологических процессов прудовика пока не выяснена.

IRODALOM — REFERENCES — ЛИТЕРАТУРА

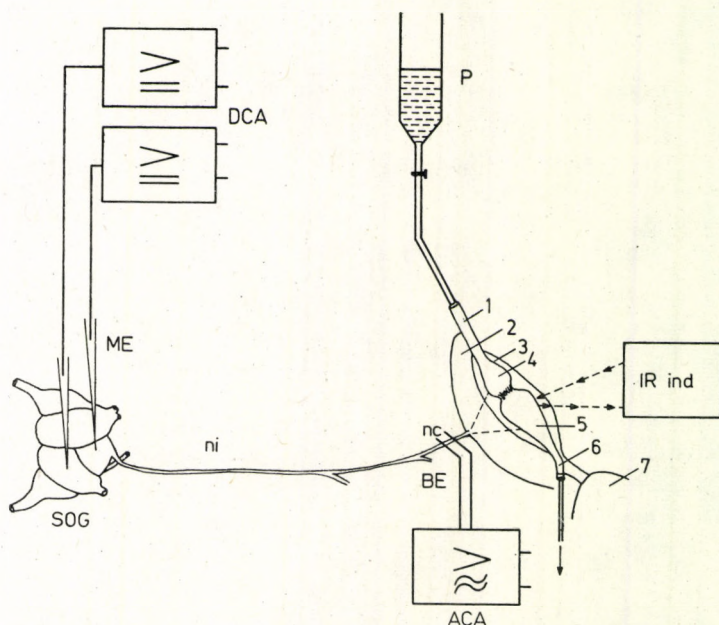
1. S.-RÓZSA, K. (1976): A szív működést szabályozó neuronhálózat szerveződése *Helix pomatia* L. (Gastropoda) központi idegrendszerében. — *MTA Biol. Oszt. Közl.* **19**, 63—107.
2. S.-RÓZSA, K. (1976): Neuronal network underlying the regulation of heart beat in *Helix pomatia* L. — In: *Neurobiology of Invertebrates. Gastropoda Brain.* (Ed. J. SALÁNKI) Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 597—613.
3. S.-RÓZSA, K., J. SALÁNKI (1973): Single neurone responses to tactile stimulation of the heart in the snail, *Helix pomatia* L. — *J. Comp. Physiol.* **84**, 267—279.
4. S.-RÓZSA, K., J. SALÁNKI (1974): Retrograd intracellular staining and identification of Gastropoda neurones with CoCl_2 . — *Acta biol. Acad. Sci. hung.* **25**, 222.

5. S.-RÓZSA, K., J. SALÁNKI (1974): The role of interneuronal connections in the regulation of heart beats in the snail, *Helix pomatia* L. — *Annal. Biol. Tihany* **41**, 45—55.
6. KISS, I., J. SALÁNKI (1977): Examination of some morphological properties and axonal pathways of giant neurones in the central nervous system of *Lymnaea stagnalis*. — *Comp. Biochem. Physiol.* **57A**, 107—114.
7. KISS, I., J. SALÁNKI (1976): Functional and branching characteristics of neurones identified by CoCl_2 staining in the central nervous system of *Lymnaea stagnalis*. — *Neurobiology of Invertebrates. Gastropoda Brain* (Ed. J. SALÁNKI) Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 101—109.
8. SALÁNKI, J., TRUONG VAN BAY (1975): Sensory input characteristics at the chemical stimulation of the lip in the snail *Helix pomatia* L. — *Annal. Biol. Tihany* **42**, 115—128.
9. SALÁNKI, J., TRUONG VAN BAY (1976): Peripheral and central discrimination of chemoreceptor stimulation in the snail, *Helix pomatia* L. — *Neurobiology of Invertebrates. Gastropoda Brain* (Ed. J. SALÁNKI) Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 497—510.

S.-RÓZSA KATALIN

H-8237 Tihany

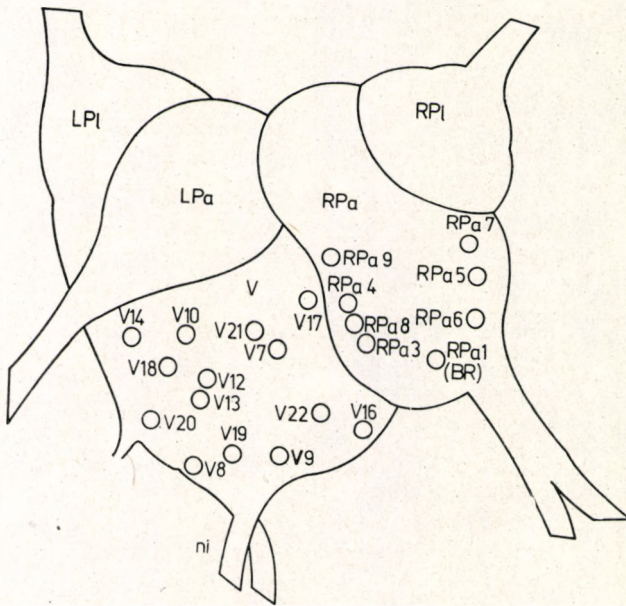
Biológia, Hungary



1. ábra. Kísérleti elrendezés a szív és központi idegrendszer kapcsolatának vizsgálatára. SOG = garat alatti ganglionok; *ni* = intestinalis ideg; *nc* = intestinalis ideg szívhez menő ága. 1 = vena pulmonalis; 2 = máj; 3 = pericardium; 4 = pitvar; 5 = kamra; 6 = aorta; 7 = vese. *P* = fiziológiás oldatot tartalmazó perfúziós edény; *DCA*, *ACA* = erősítők; *ME* = mikroelektrodák; *BE* = bipoláris elektróda; *IR_{ind}* = fotooptikus berendezés a szívkontrakciók regisztrálására

Fig. 1. The experimental arrangement for studying the connection of the heart and central nervous system. *SOG* = suboesophageal ganglia; *ni* = intestinal nerve; *nc* = cardiac branch of the intestinal nerve. 1 = pulmonal vein; 2 = liver; 3 = pericardium; 4 = auricle; 5 = ventricle; 6 = aorta; 7 = kidney. *P* = perfusion chamber with physiological solution; *DCA*, *ACA* = amplifiers; *ME* = microelectrodes; *BE* = bipolar electrodes; *IR_{ind}* = photoelectric arrangement for the registration of heart contractions

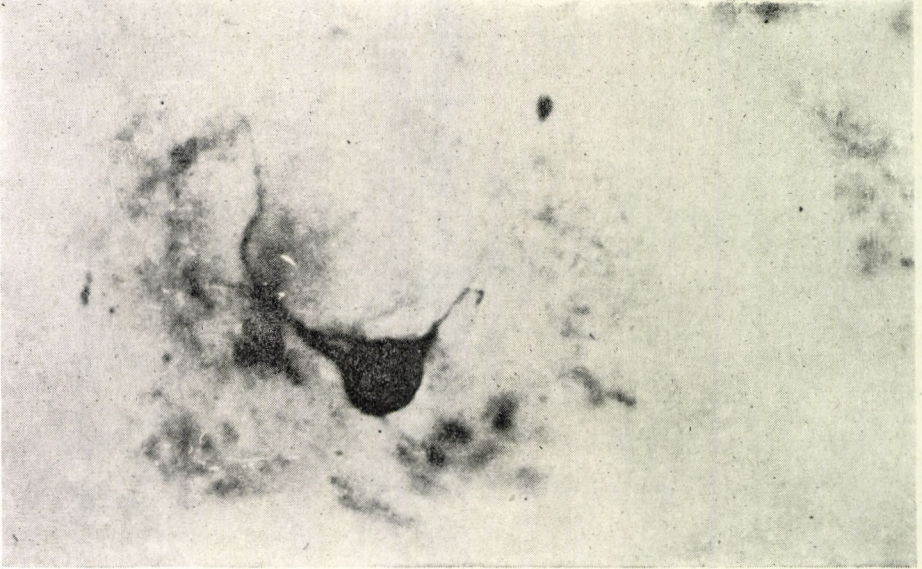
Рис. 1. Экспериментальные условия для изучения связи сердца и центральной нервной системы. *SOG* — подглоточные ганглии; *ni* — интестинальный нерв; *nc* — сердечная ветвь интестинального нерва. 1 — легочная вена; 2 — печень; 3 — перикард; 4 — предсердие; 5 — желудочек; 6 — аорта; 7 — почки. *P* — сосуд для перфузии сердца, содержащий физиологический раствор; *DCA*, *ACA* — усилители; *ME* — микроэлектроды; *BE* — биполярные электроды; *IR_{ind}* — фотооптическое устройство для регистрации контрактуры сердца



2. ábra. *Helix pomatia* szív működésének szabályozását ellátó neuronok elhelyezkedése a központi idegrendszerben. A ganglionok elnevezésének rövidítése: *V* — viscerális ganglion; *LPa* — bal parietális ganglion; *RPa* — jobb parietális ganglion; *LPl* — bal palliális ganglion; *RPl* — jobb palliális ganglion

Fig. 2. Localization of neurones taking part in the regulation of heart activity in the central nervous system of *Helix pomatia* L. The abbreviation of the name of ganglia: *V* — visceral ganglion; *LPa* — left parietal ganglion; *RPa* — right parietal ganglion; *LPl* — left pallial ganglion; *RPl* — right pallial ganglion

Рис. 2. Расположение клеток в центральной нервной системе виноградной улитки, участвующих в регуляции сердца. Сокращенные названия ганглиев: *V* — висцеральный ганглий; *LPa* — левый париеальный ганглий; *RPa* — правый париеальный ганглий; *LPl* — левый паллиальный ганглий; *RPl* — правый паллиальный ганглий

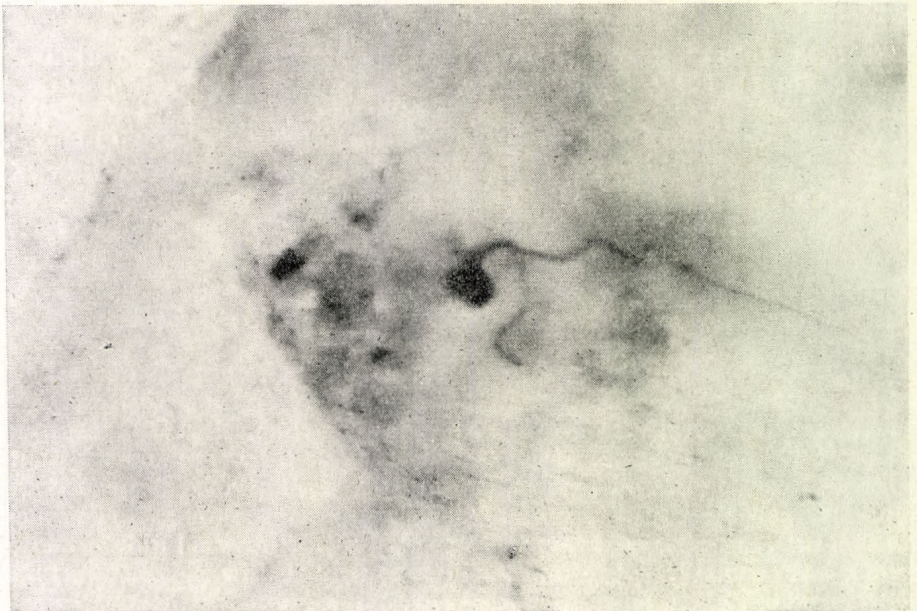


A

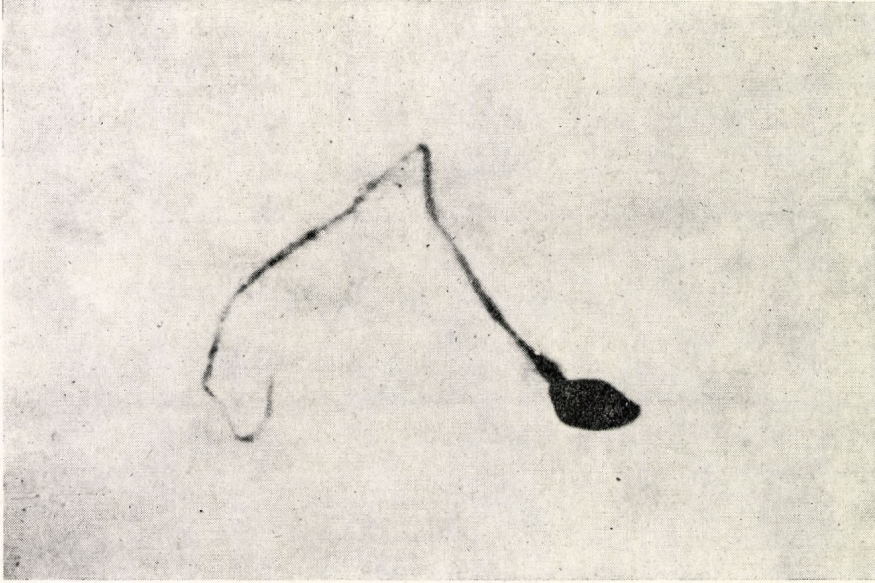
3. ábra. Szenzoros (A), motoros (B) és interneuron (C) alakja és helyzete, valamint egy elektromosan, axo-axonálisan kapcsolt sejtpáros (D) a soma CoCl_2 -vel történt feltöltés után

Fig. 3. Shape and localization of sensory (A), moto-, (B) and interneurons (C), as well as electrically coupled pair of cells (D) through an axo-axonal synapse after intracellular injection of CoCl_2

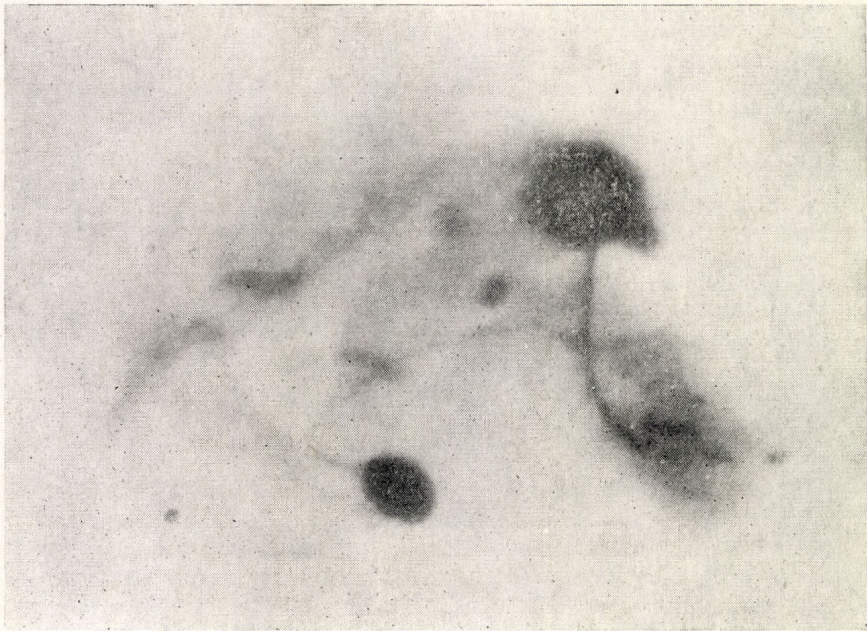
Рис. 3. Расположение и вид сенсорной клетки (A), мотонейрона (B), интернейрона (C) и электрически связанной через аксо-аксонный синапс пары клеток (D) после введения в сому CoCl_2



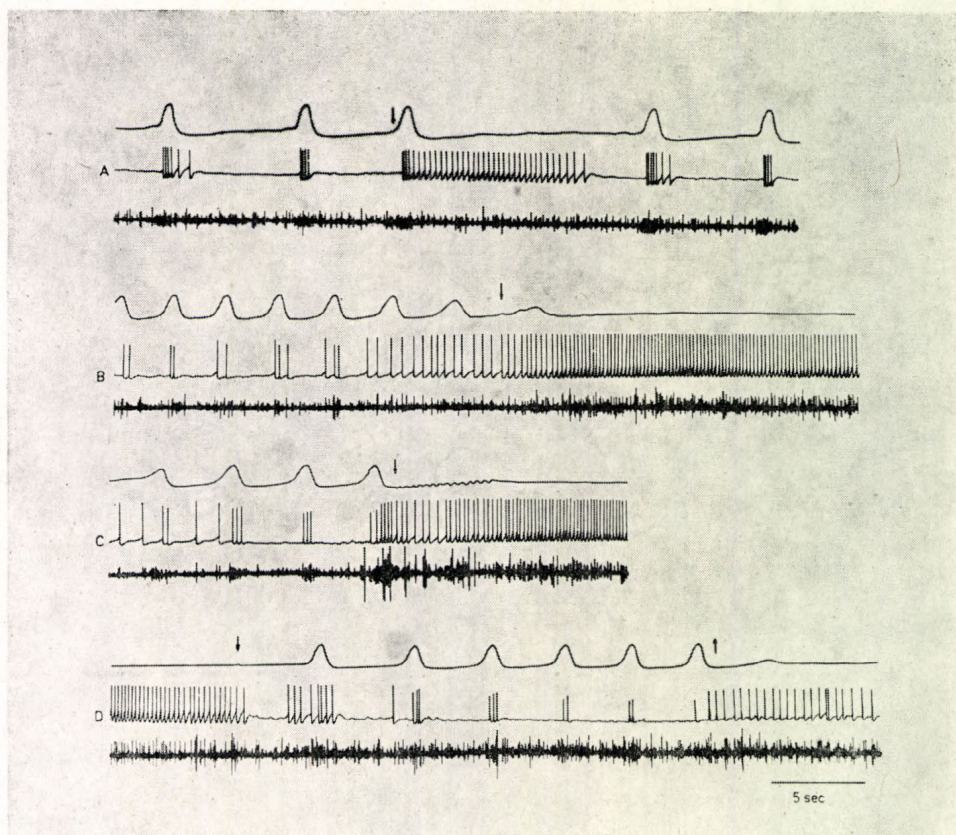
B



C



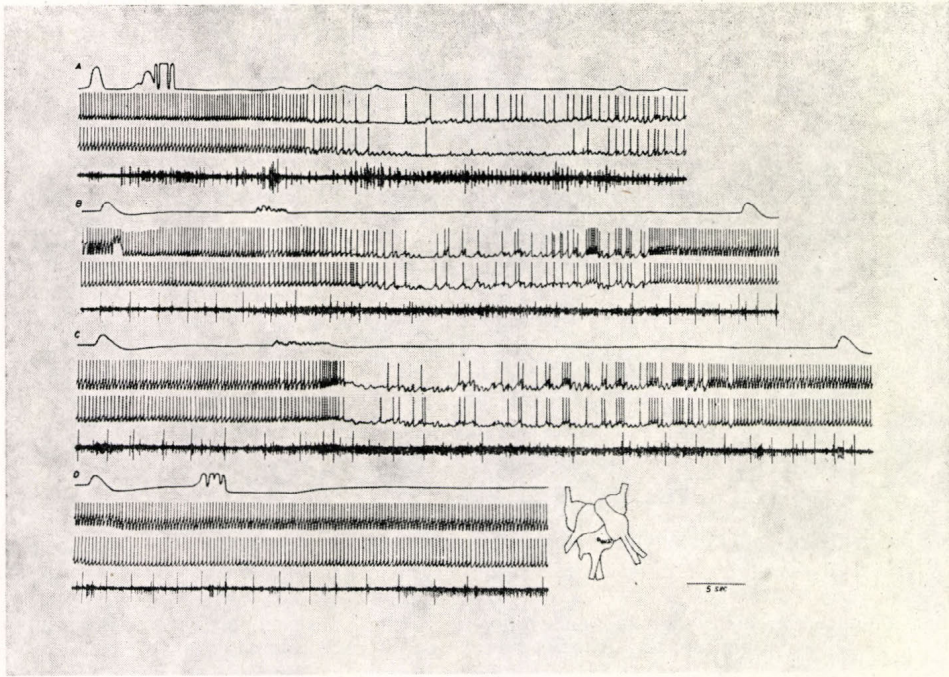
D



4. ábra. A V21 sejt fázisos és tónusos működése a szív ingerlése nélkül, majd a pericardiális rendszer különböző elemeinek ingerlésekor. A — a szív; B — a pericardium; C — a vese ingerlése. D — a fény hatása a V21 sejt aktivitási mintázatára. ↓ — hatás kezdete; ↑ — hatás vége

Fig. 4. Firing of cell V21 in the absence of heart stimulation, then the stimulation of various parts of the cardio-renal system. Stimulation of the heart (A), pericardium (B), kidney (C). D — effect of the illumination on the activity of neuron V21. ↓ — the beginning and ↑ — the end of stimulation

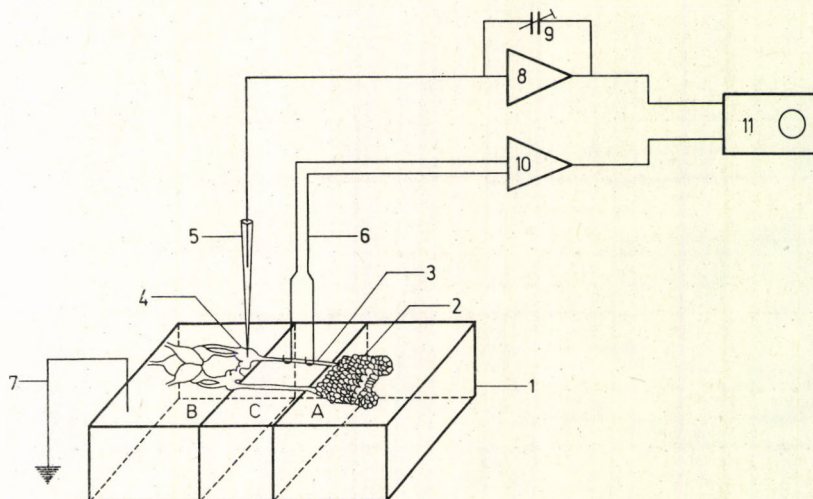
Рис. 4. Активность клетки V21 в отсутствии раздражения сердца, затем во время раздражения разных участков кардио-рениальной системы. Раздражение сердца (A), перикарда (B) и почки (C). D — влияние освещения ганглиев на активность клетки V21. ↓ — начало воздействия, ↑ — окончание воздействия



5. ábra. A V22 sejt, valamint sejt párjának aktivitása. A — a szív; B — a vese és C — a véna ingerlése mindkét sejten nagy GPSP-k megjelenéséhez vezet. Az aorta (D) ingerlése hatástalan

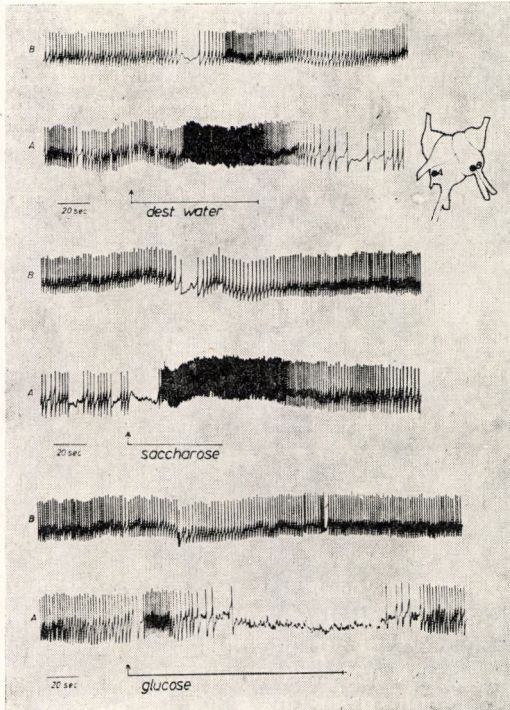
Fig. 5. The activity of cell V22 and that of the symmetrical pair of this neurone. The stimulation of the heart (A), kidney (B) and vein (C) lead to the generation of large IPSP-s on both cells. The stimulation of the aorta (D) was ineffective

Рис. 5. Активность клетки V22 и её партнерной клетки. Раздражение сердца (A), почки (B) и вены (C) приводит к появлению больших ТПСР на обеих клетках. Раздражения аорты (D) не вызывает ответа



6. ábra. *Helix pomatia* agy-szájszerv preparátum az íz-megkülönböztetés vizsgálatára
 Fig. 6. Brain-mouth preparation for studying the discrimination of the taste on *Helix pomatia* L.

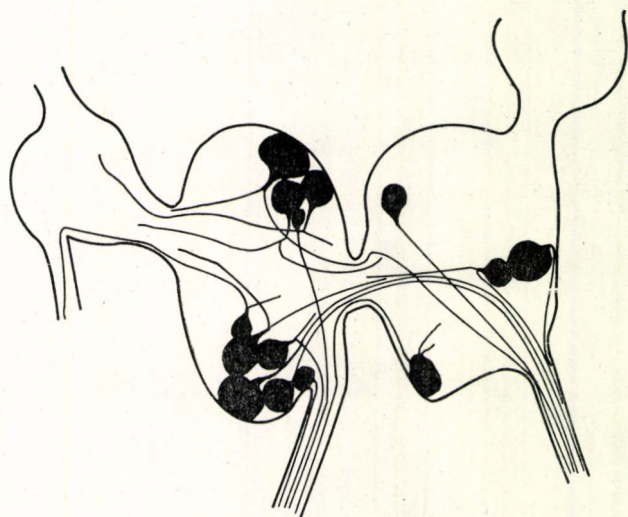
Рис. 6. Препарат, содержащий окологлоточные ганглии, ротовой орган и связывающий их нерв, виноградной улитки для изучения дискриминации вкуса



7. ábra. Két neuron aktivitásának változása az ajak receptorok desztillált vízzel, szacharózzal és glukózzal történő ingerlésekor. A vizsgált neuronok elhelyezkedését a központi idegrendszerben a vázlat mutatja

Fig. 7. Changes in the activity of two neurones upon the application of distilled water, saccharose and glucose on the receptors of the mouth. The localization of the investigated neurones in the central nervous system is shown on the scheme

Рис. 7. Изменения активности двух нейронов во время раздражения рецепторов ротовой области при помощи дистиллированной воды, сахарозы и глюкозы. Расположение исследуемых нейронов в центральной нервной системе указано на схеме



8. ábra. Identifikált óriásneuronok axonpályáinak vázlata *Lymnaea stagnalis* viscerális és jobb parietális ganglionjaiban

Fig. 8. Scheme of the axonal pathways of the identified giant neurones in the visceral and right parietal ganglia of *Lymnaea stagnalis* L.

Рис. 8. Схема аксонных путей идентифицированных гигантских нейронов в висцеральном и правом париеальном ганглиях прудовика