

**Bagyura Zsolt ÁOK VI, Pócsai Károly ÁOK VI**

Semmelweis Egyetem, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet, Budapest, Tűzoltó utca 58.

### **Sejtek jelölődése egyes basalis lamina- és dystroglycan-komponensekkel az adenohipophysiben**

A jelen vizsgálatok egy nagyobb, a hypophysisen végzett vizsgálat sorozat részét alkotják, amelynek során a laminin-receptorként szolgáló dystroglycan komplex (DGC) komponenseinek, valamint a lamina basalis egyes komponenseinek eloszlását vizsgáltuk. A vizsgálatok kifejlett, hím és nőstény, Wistar törzsbeli, albinó patkányokon történtek. Ketamin-xilazin anaesthesiát követően az állatokat 4%-os, pufferelt paraformaldehid oldattal transzkardiálisan perfundáltuk. A reakciókat vibratómmal készített lebegő metszeteken (70 µm) végeztük, immunfluoreszcens módszerrel. A lamina basalis komponenseinek vizsgálatára

anti-laminint (poliklonális, nyúl, 1:100), anti-perlecan (poliklonális, patkány, 1:100) és anti-agrint (monoklonális, egér, 1:100) használtunk. A dystroglycan-komplex részei közül vizsgáltuk magát a laminin-kötő részt (anti-dystroglycan, monoklonális, egér, 1:100), az őt az aktin-rendszerrel összekötő komponenseket (anti-utrophin, anti-dystrophin, mindkettő 1:10, monoklonális, egér), valamint az ioncsatornákat rögzítő syntrophint, és a szignalizációs rendszerrel kapcsolatot tartó dystrobrevint (poliklonális, nyúl, 1:100). Valamennyi antitest kereskedelemben kapható gyári készítmény volt. A vizsgált anyagok, mint várható volt, jól kirajzolták az adenohipophysis ereit ill. a sejtfészkek határait. Konfokális mikroszkóppal vizsgálva azonban az is látható volt, hogy egyes sejtek is jelölődnek (főleg perleccannal, de pl. lamininnal, dystroglycannal, dystrophinnal is). Kettős jelzéssel látható volt, hogy legalább részben különböző sejtekről van szó. Az intermedier lebeny sejtjei markáns dystrobrevin és syntrophin immunreaktivitást mutatnak, de dystroglycan-negatívak. A sejteket megvizsgáltuk a pars distalis közismert hormonjai elleni ellenanyagokkal is. A megfigyelt sajátosságoknak jelentőségük lehet az adenohipophysis sejtcsoportjainak szerveződésében, amit eddig véletlenszerűnek tartottak. Ebben a témában munkacsoportunk még nem publikált.

Témavezető: Dr. Kálmán Mihály

**Behrends Dominique, English Language Program, IV, Balog Ágnes, ÁOK, IV**  
Semmelweis Egyetem, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet, Szentágotthai Laboratórium,  
Budapest

**Patkány filum terminale neuronális szerkezete**  
**Neuronale Gliederung des Filum terminale in der Ratte**

Emberben és az emlősállatokban a gerincvelő caudalis vége (conus medullaris) vékony kötegben (filum terminale, FT) folytatódik. A klasszikus és a modern tankönyvek valamint az összefoglaló monográfiák szerint a FT glia sejtekből és a gerincvelő burkainak folytatásaként értelmezhető kötőszövetből áll. Laboratóriumunkban folyó immunhisztokémiai vizsgálatok kiderítették<sup>1</sup>, hogy patkány a FT-ban - a gazdagon elágazódó glia sejtek között - magokba rendezett neuronok és axon nyálábok helyezkednek el. A FT megőrizte a gerincvelő szerkezeti vonásait: a periférián myelinhüvelyes és myelinhüvely-nélküli idegrostok (fehérállomány), ezen belül a neuron csoportok találhatóak (szürkeállomány). A FT közepén az ependyma sejtekkel bélelt canalis centralis folytatása húzódik. Az említett közlemény adatai a FT proximális 1 cm hosszú szakaszára vonatkoztak. Jelen előadásban a FT distális szakaszának a neuronális szerkezetéről kívánunk beszámolni.

Kísérleteinkhez fiatal különböző nemű Wistar patkányokat használtunk. Az állatok mély altatása majd paraformaldehid oldattal történő perfundálása után felnyitottuk a gerinccsatornát, és kivettük a gerincvelő caudalis részét. Kipreparáltuk és több - 4-5 mm-es - szakaszra osztottuk FT-t. Az agarba ágyazott darabkákból Vibratommal 50µm vastag metszeteket készítettünk. Az antitest penetrációját növelő kezelés és a blokkolási eljárás után a metszetek - többes immunfluorescens jelölés céljából - 3 napig, +4°C-on, különböző primer antitest-keverékekben inkubáltuk. A neuronokat neuronal perikaryal protein (NeuN) markerrel, a perifériás érző rostokat substance P-vel (SP), a neurotransmisszióban részt vevő peptideket neurokinin-1-gyel (NK-1) jelöltük. Cholinerg idegrostok és neuronok jelölésére cholin acetyltransferázt (ChAT), a leszálló pályák rostjainak jelölésére serotonint (5-HT) és enkephalint használtunk. Perifériás eredetű idegrostok jelölése vesicularis glutamat 1-gyel (VGluT1), centrális eredetű axonok jelölése vesicularis glutamat 2-vel (VGluT2), szinaptikus végződések jelölése synaptophysinnel (SYN) történt. Astrocyták kimutatására glial fibrillary acidic proteint (GFAP) alkalmaztunk. Az antitestek láthatóvá tételére a primer ellenanyagoknak megfelelő, számban termelt, különböző színjelölésű másodlagos fluorochromokat alkalmaztunk. Az immunfluorescens preparátumok elemzését konfokális lézermikroszkóppal végeztük.

Vizsgálatainkból kiderült, hogy a FT dorsalis magja caudal felé haladva hamar megszűnik, de a lateralis magok hosszan követhetők. Egyre több perikaryont találtunk közvetlenül az ependyma sejtek mellett. A SP-, 5-HT és enkephalin pozitív rostok a vizsgált metszetekben végig követhetők voltak. Caudal felé haladva megmarad a dorsolateralis, u.n. váll régióban az enkephalin rostok csoportosulása. – megállapítottuk, hogy a neuronok és axon nyálábok, csekély átrendeződéssel, a FT distális részében is folytatódnak. (Német nyelvű előadás)

Témavezető: Dr. Réthelyi Miklós

<sup>1</sup>Boros Cs., Lukácsi E., Horváth-Oszwald E., Réthelyi M. Neurochemical architecture of the filum terminale in the rat. Brain Res., 1209 (2008) 105–114

## Bercsényi Kinga ELTE TTK, IV. évfolyam

MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet, Budapest

### A cadherin-13 szerepének vizsgálata az agykéreg embrionális fejlődésében

A cadherin-13 (*cdh13*, korábbi nevén H-cadherin, vagy T-cadherin) a cadherin szupercsalád egyik önálló, alcsaládba be nem sorolható tagja, mivel nem rendelkezik sem transzmembrán, sem pedig intracelluláris régióval, és egy GPI (glikozil-foszfatidilinozitol) horgony rögzíti a sejtmembrán külső oldalához.

Ennek a különleges cadherinnek az idegrendszerben betöltött szerepét ezidáig csak *in vitro* vizsgálták, ahol az axonlefutás szabályozásában betöltött szabályozó szerepét mutatták ki. Munkám során *in vivo* vizsgálatokkal szeretnék fényt deríteni a cadherin-13 központi idegrendszeri expressziójára és szerepére a *neocortex* fejlődésében.

Az expressziós mintázat vizsgálatát mRNS és fehérje szinten kriosztáttal és vibratommal készített különböző korú egér agyának metszetein végeztem *in situ* hibridizációs technikával (ISH) és immunhisztokémiával. Ezek a vizsgálatok kimutatták, hogy a cadherin-13 expressziója dinamikusan változik az embrionális fejlődés során. 13 napos embrionális korban még szelektíven csak a marginális zónában és a kortikális lemezben vannak *cdh-13* mRNS-t detektálható mennyiségben tartalmazó sejtek, míg az újszülött és a felnőtt korú egér agyában már több, *cdh-13*-at nagy mennyiségben termelő régió van, ilyen például a hippokampusz, a bazális ganglionok és az agykéreg. Az agykéregben az V. réteget alkotó piramis sejtek, és az elszórtan elhelyezkedő interneuronok jelölődtek mind az ISH, mind pedig az immunhisztokémiai vizsgálat esetén.

A cadherin-13 szerepét az agykéreg embrionális fejlődésében az EGFP és a *cdh-13* az egyik agyfélteke kortikális ventrikuláris zónájában történő együttes túltermeltetésével vizsgáltam. 14,5 napos vad típusú egérembrió telencephalonjába *in utero* elektroporációval juttattam be a géneket tartalmazó konstrukciókat.

Csak az *egfp*-t tartalmazó vektorral történő szomatikus géntranszfer esetén a jelölt sejtek már 18,5 napos embrionális korban egy elkülönülő réteget alkotnak, és P10-es korra felveszik a II-III. réteget alkotó piramis sejtekre jellemző lokalizációt és morfológiát. Ez az eredmény megfelel az irodalmi adatoknak, miszerint 14 napos embrionális korra tehető a II-III. réteget alkotó piramis sejtek kialakulása a neurogén radiális gliasejtek aszimmetrikus osztódásával a ventrikuláris zónában.

*Egfp*-t és *cdh-13*-at tartalmazó vektorokkal történő együttes elektroporáció esetén az ektopikus *cdh-13* expressziót mutató sejtek a kontrollal ellentétben 18,5 napos embrionális korban még nem alkotnak egy elkülönülő réteget, valamint több sejt található az intermedier és a szubventrikuláris zóna (SVZ) határán, mint a kortikális lemezben. Ezen felül bizonyos sejtrészletek bejutnak a marginális zónába is, amit csak *egfp*-vel történő elektroporációkor nem tapasztalunk. Ezek a partikulumok, valamint a belőlük eredő radiális nyúlványok GFAP (glial fibrillary acidic protein)-ra nézve immunreaktivitást mutatnak, tehát tartalmazzák a kizárólag gliákra jellemző intermedier filamentum fehérjét. Az SVZ-ben tartózkodó sejtek MAP2b (mikrotubulus asszociált protein)-re specifikus antitesttel végzett immunhisztokémiai vizsgálatban pozitívnak bizonyultak, és mivel ez a fehérje az érett idegsejtek markere, ezek a sejtek differenciálódott neuronoknak tekinthetők. A környezetükben nem figyeltünk meg jelölődést, tehát kijelenthető, hogy előbb differenciálódtak, mint a velük egy régióban levő egyéb sejtek.

Eredményeim szerint a cadherin-13 ektopikus expressziója drámai hatással bír a kérgi piramis sejtek vándorlására és differenciációjára is. Reményeink szerint a *cdh-13* idegrendszeri hatásának pontos leírásával, és a hatás molekuláris mechanizmusának feltárásával közelebb juthatunk ahhoz, hogy a neuronális hálózat kialakulásának szabályozását megértsük. Így az ezen folyamatok hibáiból fakadó betegségek patomechanizmusának pontosabb megismerésével lehetővé válik célzottabb gyógymódok kifejlesztése is.

Témavezető: Dr. Lele Zsolt

**Bodogán Tímea, ELTE TTK biológus V.**

Semmelweis Egyetem Anatómia, Szövet- és Fejlődéstani Intézet, Budapest

### **A posztnatális alkoholfogyasztás hatása az agyi sejtproliferációra házi csirkében**

Az agy fejlődése során alkalmazott alkoholbeadás rágszálókban sejtpusztulást okoz a legtöbb agyterületen, ugyanakkor bizonyos régiókban alkohol hatására a sejtek számának növekedése figyelhető meg. Ez utóbbi jelenséget a szakirodalomban általában megemelkedett neuron- és/vagy gliaproliferációval magyarázzák. Habár a házicsirke, mint a különböző neurotoxikus hatások embrionális modellje, széles körben elterjedt, az alkohol csirkékre gyakorolt posztnatális hatásairól keveset tudunk.

Kutatásunk célja kideríteni, mennyiben befolyásolja az új sejtek keletkezését a rendszeres, nagy mennyiségű alkoholfogyasztás fiatal csirkékben. Ehhez a kikéltést követően minden nap meghatározott mennyiségű alkoholt (25%-os alkohol-oldat) juttattunk be egy szondán keresztül a csirkék begyébe. Összesen 18 frissen kikelt házi csirkét három, 6-6 egyedű csoportba osztottunk. Az első és második csoport állatai eltérő mennyiségű alkoholt kaptak: az egyik 5 g/testtömeg kg alkoholt naponta, a másik pedig 2,5 g/testtömeg kg-ot. A kontroll csoport nem kapott alkoholt, helyette azonos mennyiségű fiziológiás sóoldatot adtunk be. Az 1 hetes alkoholos kezelést követően az állatokba i.p. bróm-dezoxi-uridint (BrdU) fecskendeztünk. Ez az anyag a DNS-szintézis során beépül a timidin helyére, ezáltal kijelöli a beadás után keletkezett sejteket. Egy nap múlva az állatokat perfundáltuk, a kivett agyukat lemetszettük és a BrdU tartalmú sejteket fluoreszcens immunhisztokémiával tettük láthatóvá. A vizsgált területekről (hippocampus, nucleus accumbens, medialis striatum) konfokális mikroszkóppal készített képeken megszámláltuk az újonnan keletkezett sejteket. Végül az adatokat statisztikailag elemeztük.

Eredményeink: az alkohol kis dózisban (2,5 g/ttkg/nap) csökkenti az újonnan keletkező sejtek számát. Nagyobb dózisban (5 g/ttkg/nap) ez a hatás megszűnik, ami valószínűsíti, hogy az agy megemelkedett proliferációval kompenzálja a nagyobb mennyiségű alkohol erősebb neurotoxikus hatását. Adataink alapján nem zárható ki, hogy az alkohol az egyes agyterületek sejtproliferációjára eltérően hat. Az állatok testtömeggyarapodására a kezelések nem voltak hatással, így kizárhattuk azt a hipotézist, hogy az intenzívebb proliferáció a megemelkedett kalóriabevitelnek köszönhető.

Kísérletünk az egyik első lépés abban, hogy az alkoholnak az idegrendszer fejlődésére gyakorolt hatását egy új modellen, a csirkén vizsgálhassuk. Az újszülött patkányok a napszibikkal összehasonlítva kevésbé fejlettek, ráadásul utóbbiak idegrendszeri érésének időbeli lefutása jobban hasonlít az újszülött csecsemőkére, mint a patkányoké. Ezért indokolt lehet csirkéket használni az ember idegrendszeri fejlődésének modellezésére, a nagyobb filogenetikai távolság ellenére is.

Témavezetők: Dr. Csillag András, Zachar Gergely

## **Domonkos Andor ÁOK III**

Magyar Tudományos Akadémia – Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet, Budapest

### **Hippocampalis GABAerg interneuronok rövid késleltetésű, nagy hatékonyságú aktivációja nucleus raphe medianus ingerlésére**

Az agytörzsi nucleus raphe medianusból (median raphe: MR) induló raphe-hippocampalis pálya alapvető szerepű a hippocampus aktivitásának szabályozásában. A pálya szerotoninerg rostjai a hippocampusban szelektíven GABAerg interneuronokkal szinaptizálnak. A MR-ban szerotonin-tartalmú sejtek mellett GABAerg, illetve vezikuláris glutamát-transzportert (VGLUT3) kifejező neuronok is előfordulnak. Az utóbbi felfedezés felvetette a szerotoninerg-glutamáterg kotranszmisszió lehetőségét. A MR ingerlése a GABAerg sejtpopuláció aktivációját idézi elő. Kezdeti kísérleteinkben kimutattunk egy eddig leírtaknál gyorsabb serkentő választ hippocampalis interneuronokban MR-ingerlés hatására. Jelen munkában e serkentő kapcsolat fiziológiai és farmakológiai tulajdonságait vizsgáltuk. Uretánnal altatott patkányok hippocampusában kerestünk juxtacelluláris elvezetési technikával MR elektromos ingerlésére 15 ms-nál rövidebb késleltetéssel aktiválódó interneuronokat. A serkentő válasz farmakológiájának vizsgálatához AMPA-típusú glutamát-receptor antagonistát iontoforetizáltunk az elvezetett sejt közelébe és / vagy intraperitoneálisan 5-HT<sub>3</sub> típusú szerotonin-receptor-blokkolót adtunk. A hippocampalis EEG-aktivitást is követtük. A mérés után a választ mutató neuront azonosítás céljából neurobiotinnal megpróbáltuk feltölteni. Regisztráltuk 60 hippocampalis sejt választát a MR 1 Hz-es, 1, 0.7, vagy 0.5 mA-os stimulálására. Az 52 választ mutató sejtnél gátlást (n = 22), 50 ms-nál nagyobb (n = 4), illetve 20-50 ms-os késleltetésű facilitációt találtunk (n = 7). Tizenhat sejt mutatott 15 ms-nál rövidebb, 9.11±3.02 ms-os (median ± interquartilis range) késleltetésű, időben fókuszált (időtartam: 6.97±4.25 ms) serkentést. A válasz sikerrátája 65.22±38.1%-ot ért el. A válasz tulajdonságai alapján feltételeztük glutamát részvételét ennek továbbításában. Ennek tesztelésére 6 sejten az AMPA-típusú glutamát-receptor antagonistá (NBQX) hatását vizsgáltuk: a drog-iontoforézis kezdetétől számított 2., illetve 5. percben a válasz sikerrátája a kontroll 58.3±14.9%-ára, illetve 29±38%-ára csökkent, kinetikája nem változott. Az iontoforézis leállítása után a vizsgált sejtek 75%-ánál a válasz visszaállt a kontroll szintre. Három sejtnél az NBQX hatása ismételtelen is kiváltható volt. Önmagában az 5-HT<sub>3</sub> típusú szerotonin-receptor-blokkoló (ondansetron) 4 neuron esetében csökkentette, 2-nél pedig növelte a válasz sikerrátáját. Egy kísérletben ondansetron adását követően NBQX-t iontoforetizáltunk, mely a válasz sikerrátáját az ondansetron utáni szintnél tovább csökkentette. Jelen munkánkban leírtunk egy gyors és hatékony, szerotoninerg-glutamáterg kapcsolatot az MR és a hippocampus – többnyire, de nem kizárólag, kolecisztokonint tartalmazó – interneuronjai között, mely nagy időbeli felbontással szabályozhatja a hippocampus működését.

#### **Publikációk**

1. Varga V., Kránitz K., Hangya B., Domonkos A., Freund TF., Borhegyi Zs (2007) Very short latency, temporally focused responses of hippocampal interneurons to the stimulation of the median raphe nucleus. Program Number: 145.15, *Abstract Viewer / Itinerary Planner*, 37th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, CA, USA.

2. Varga V., Domonkos A., Borhegyi Zs., Hangya B., Freund T. (2008) Analysis of the short latency, partly serotonin-independent response of hippocampal interneurons to the stimulation of the midbrain raphe nuclei. *Forum of Young Physiologists*, Debrecen, Hungary

A fenti posztterekben a TDK-előadásomban ismertetésre kerülő fiziológiai vizsgálatok egy része (7/16 és 11/16 elvezetés) és a kezdeti farmakológiai vizsgálatok eredményei szerepeltek. A glutamát szerepének bizonyítása a jelen előadás tárgyát képező kísérletekben történt meg.

Témavezető: Dr. Varga Viktor

## **Galgóczy Péter ÁOK III, Bindics Kinga ÁOK IV**

Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet  
Budapest, IX. Tűzoltó u. 58.

### **GFAP és nestin immunpozitivitás követése cerebellaris lézió során**

A kísérlet célja a Bergmann-gliának a kisagy molekuláris réteg sérüléseire adott válaszána vizsgálat volt. Ez a glia igen rendezett, egymással párhuzamos nyúlványokat alkot, amelyek szubmeningeális végtalpakat képeznek. Kérdés, az ilyen glia képes-e átrendeződni, expresszál-e nestint, az éretlen neuroepiteliális elemekre jellemző fehérjét, amely a gliareakciók során általában megjelenik.

A lézió egyszerű szűrés volt, amit hím és nőstény patkányokon a nyakszirtecsonton fűrt lyukon végeztünk steril serum 1-es tüvel. A műtét ketamin-xilazin anesztéziában történt. Túlélési időre 4, 7, 14 napot szántunk. A műtött patkányokat és két kontrollállatot transzkardiálisan perfundáltunk fiziológiás sóoldattal, majd 4%-os paraformaldehiddel. A patkányok agyát 24 órán keresztül immerziósan fixáltuk 4%-os paraformaldehidben, majd mikrotómmal 100 µm-es metszeteket készítettünk, amelyeket 24 órán keresztül PBS-ben (foszfátpuffer) mostunk. A szeletek közül a léziót tartalmazókat sztereomikroszkóppal válogattuk ki. A metszeteket immunfluoreszcens módszerrel dolgoztuk fel. A nem specifikus antigénkötés ellen 20%-os kecskeszérumot használtunk 90 percig. Ezt követően primer antitestként anti-GFAP-t (nyúl, poliklonális, 1:500 hígításban) és anti-nestint (egér, monoklonális, 1:1500 hígításban) alkalmaztunk két napig 4 Celsius fokon. Ezek láthatóvá tételéhez fluoreszcens festékekkel kapcsolt szekunder antitesteket, Cy3-hoz kötött anti-egér és FITC-hez kapcsolt anti-nyúl antitesteket használtunk. A szeleteket glicerines oldatban tárgylemezre húztuk fel, majd digitális kamerával felszerelt lézerkonfokális mikroszkóppal fényképeztük le.

A lézió hatására a következő változások történtek: a) nestin expresszálódott a Bergmann-gliában ami kb. a 7. posztoperatív napig domináns volt az érett gliára jellemző GFAP-val szemben, melynek immunreaktivitása csak ezután kezdett fokozódni; b) nestin-immunoreaktív asztrociták jelentek meg; c) hosszabb idő (7-14 nap) alatt a Bergmann-glia részben átrendeződött és a sérülés felé oldalágakat alakított ki. Említésre érdemes, hogy a nestin és a GFAP nem szoros kolokalizációban fordult elő, hanem a glianyúlványok más-más szakaszán. Az eredmények arra utalnak, hogy az érett gliára jellemző nestin expressziója még egy magasan szervezett gliaféleségnél is megindulhat, amelynek nyúlványai nem mozgékonyak. Munkacsoportunkban hasonló típusú léziókat követően már vizsgáltuk a GFAP változásait (Ajtai és Kálmán, 1998)<sup>1</sup>, a jelen kísérletsorozat ezt a nestinre is kiterjeszti.

A kutatás részét képezi az OTKA 60930 számú programjának (vezető Prof. Kálmán Mihály).

Témavezető: Dr. Adorján István

<sup>1</sup> Ajtai B, Kálmán M Glial fibrillary acidic protein expression but no glial demarcation follows the lesion in the molecular layer of cerebellum. Brain Res (1998) 802:285-288

## Gáti Georgina ÁOK IV.

Semmelweis Egyetem, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet, Budapest

### A periszinaptikus régió extracelluláris mátrixának vizsgálata patkány agyvelőben

A központi idegrendszerben az idegsejteket extracelluláris mátrix veszi körül. A mátrix jellegzetes megjelenési formája, amikor bizonyos típusú neuronok teste és proximális dendritjei körül halmozódik fel, az így létrejött struktúrát perineuronális hálónak nevezzük. Előfordulásuk és időbeli megjelenésük alapján a szinaptikus stabilizációban, az ionhomeosztázisban és neuroprotekciónban vélik szerepüket felfedezni.

Jelen vizsgálatunk a preszinaptikus bouton körüli mátrix képződését vizsgálja. Eddigi feltevések szerint a periszinaptikus régió körüli mátrixállományt a célsejt, és nem az axonhoz tartozó projekciós sejt termeli. Legújabb, humán agyszövetben készült vizsgálatok azonban találtak vélhetően szinaptikus bouton körüli mátrixállományt perineuronális háló nélküli thalamicus idegsejten is. Ez arra enged következtetni, hogy periszinaptikus mátrixot nem csak a célsejt, hanem a projekciós neuron is képes termelni. Ez új feltevés, melyet sem témavezető, sem tudomásunk szerint más kutatócsoport még nem vizsgált. Azt jelentené, hogy a szinaptikus stabilizációban a projekciós sejt tölt be meghatározó szerepet.

Kísérleteinket felnőtt patkányban végeztük. Az állatokban mély altatásban *in vivo* pályakövetést végeztünk, az extracelluláris mátrixot immunhisztokémiával tettük láthatóvá. Olyan magokba juttattunk biotinilált dextrán amin anterograd pályakövető anyagot, melyek neuronjai képesek a perineuronális mátrixra jellemző komponensek termelésére, így a nucleus gracilisbe és cuneatusba, a kisagyvakba, de töltöttünk fel rostokat a nagyagykéreg vizsgálata céljából a corpus callosumon keresztül is, mert a piramissejtek egy csoportja is képes perineuronális háló termelésére. Az állatokat egy hét múlva mély altatásban transzkardiálisan perfundáltuk, a fixált agyvelőket eltávolítottuk, azokból metszeteket készítettünk. A feltöltött axonok végződéseit három különböző agyterületen vizsgáltuk, a középgyban (nucleus ruber), a köztiagyban (nucleus posterolateralis thalami) és a nagyagykéregben. Fénymikroszkópos metszeteken ellenőriztük a pályakövetést, az injekció helyét és a célterületen a feltöltött axonok végződéseit. A pályakövetéssel kombinált immunhisztokémiai kettős jelöléseket fluoreszcens szekunder antitestekkel végeztük, a jelzett elemek pontos lokalizálását konfokális lézer szkennig mikroszkóp használata garantálta.

Sok jelzett bouton körül nem találtunk immunoreaktív mátrixállományt. Más feltöltött bouton körül találtunk ugyan jelzett mátrixot, de azok a célsejt perineuronális hálójába voltak beágyazva. Izoláltan azonban csak ritkán találtunk immunoreaktív extracelluláris mátrixot szinaptikus bouton körül. Arra következtetünk, hogy a periszinaptikus régiót körülvevő és azt stabilizáló mátrixállományt sokkal inkább a célsejt, csak ritka esetben a projekciós sejt termeli meg. Az eredmények nem csak egy esetleges, hanem általános szerveződési elvet valószínűsítene a központi idegrendszerben, mert három különböző szintű és szerveződésű agyterületen is hasonló jelenséget figyeltük meg.

Témavezető: Dr. Alpár Alán, egyetemi adjunktus

Az előadás témájában a témavezető által megjelent vagy benyújtott közlemények:

Alpár A., Gärtner U., Härtig W., Brückner G.: Distribution of pyramidal cells associated with perineuronal nets in the neocortex of rat. *Brain Research* 1120: 13-22, 2006

Morawski M., Alpár A., Brückner G., Fiedler A., Arendt Th.: Postnatal development of aggrecan-based extracellular matrix in chicken (*Gallus domesticus*) brain. *Brain Research*, submitted

**Kádár Andrea, ELTE-TTK V.**  
MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet

### **A hipofiziotróf thyrotropin-releasing hormon (TRH) termelő idegsejtek elhelyezkedésének feltérképezése az egér hipotalamuszban**

A pajzsmirigyműködés szabályozásában kulcsszerepet játszanak a vér-agy gáton kívül eső eminencia medianába vetülő thyrotropin-releasing hormont (TRH) termelő idegsejtek. Ezek a hipotalamusz paraventriculáris magjában (PVN) elhelyezkedő, hipofiziotróf TRH idegsejtek szabályozzák a hipofízis TSH termelődését és ezen keresztül a pajzsmirigy hormontermelését. Patkányban a PVN nagysejtes (magnocelluláris, mPVN) és kissejtes (parvocelluláris) állományokra osztható. A parvocelluláris rész tovább osztható anterior, periventriculáris, laterális, ventrális, dorzális és mediális almagokra. Patkányban a hipofiziotróf TRH sejtek a periventriculáris és mediális parvocelluláris almagokban találhatóak. Patkányban a hipofiziotróf TRH idegsejtek egyik jellemzője a TRH és a cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) együttes előfordulása. A hipotalamusz-hipofízis-pajzsmirigy tengely vizsgálatára egyre gyakrabban használnak transzgén egereket, és mivel a PVN-ben nagyszámú nem-hipofiziotróf TRH sejt is található, szükségessé vált a hipofiziotróf TRH idegsejtek pontos lokalizációjának megismerése az egér hipotalamuszban. Kutatócsoportunk előállított a TRH sejtekben GFP-t termelő transzgén egereket, melyekben tervezzük a hipofiziotróf sejtek elektrofiziológiai vizsgálatát. Ezen vizsgálatokhoz is elengedhetetlen a hipofiziotróf TRH sejtek pontos elhelyezkedésének ismerete.

A kísérleteinkben egereknek intraperitoneálisan Fluoro-Goldot (FG) adtunk, egy olyan retrográd jelölőanyagot, amit csak a vér-agy gát-mentes területekre vetülő neuronok vesznek fel. A kezelést követő negyedik napon az állatok oldalkamrájába sztereotoxikus kontroll alatt kolhicint injektáltunk, hogy elősegítsük a TRH idegsejtek immuncitokémiai kimutatását. Az ötödik napon az állatokat túlaltattuk és paraformaldehid és akrolein keverékével perfundáltuk. Az agykból készült metszeteken TRH – Fluoro-Gold, TRH – CART és TRH – vazopresszin (AVP) kettősjelöléses immunfluoreszcens festéseket végeztünk DAPI háttérfestéssel.

Egérben TRH-idegsejtek a periventriculáris terület kivételével a PVN minden részében előfordulnak, de TRH-t és FG-ot egyaránt tartalmazó, hipofiziotróf TRH idegsejteket a parvocelluláris területen csak elszórtan figyeltünk meg a mediális parvocelluláris almag (mpPVN) elülső és középső részében, főleg a magnocelluláris állománnyal határos területeken. Nagy számban fordulnak elő hipofiziotróf TRH idegsejtek a mPVN-ben a magnocelluláris AVP sejtekkel keveredve. Azonban AVP idegsejtekben nem észleltünk TRH-immunreaktivitást és a két peptidet a patkányban észleltekhöz hasonlóan eltérő méretű sejtek termelték. CART-TRH kolokalizáció jellemzően a hipofiziotróf területeken volt megfigyelhető. Az eminencia mediana területén, szintén megfigyelhető volt a CART és a TRH kolokalizáció a hipofiziotróf axonokban.

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy az egér PVN szerveződése eltér a patkányétól. A PVN parvocelluláris és magnocelluláris aegységei egérben nem különülnek el egymástól. Megfigyeltük továbbá, hogy a hipofiziotróf TRH idegsejtek elsősorban a PVN középső részének magnocelluláris sejtek által elfoglalt területén találhatóak. A PVN periventriculáris és caudális részén, ahol patkányban számos hipofiziotróf TRH sejt fordul elő, egérben nem található kettősjelölt idegsejt. Mivel patkányhoz hasonlóan egérben is azokon a területeken figyelhető meg a CART–TRH kolokalizáció, ahol a TRH idegsejtek FG-ot vettek fel, és az eminencia mediana területén a TRH axonok tartalmaznak CART-ot, feltételezhetjük, hogy a CART egérben is fontos szerepet tölt be a hipofizeotróf TRH idegsejtek működésében.

Csoportunk csatlakozó publikációi leírják hipofízis TRH sejt CART termelését és bemutatják a CART és TRH kölcsönhatásának szerepét a hipofízis hormontermelésének szabályozásában: C. Fekete et al J Neurosci. (2000), 20:9224-34; Raptis et al. Endocrinology (2004) 145:1695. Csoportunk, más kutatócsoportokhoz hasonlóan transzgén egereken végzett kísérleteiben a patkány adatok alapján határozta meg az egér PVN-nek azon területét, ahol a hipofiziotróf TRH idegsejtek aktivitásának változását vizsgálták (Fekete et al. Endocrinology (2004) 145:4816-4821). Jelen eredményeink ismeretében vizsgálatainkban pontosabban meg tudjuk határozni a hipofiziotróf TRH idegsejteket tartalmazó területet, ami nagymértékben elősegíti hipotalamusz-hipofízis-pajzsmirigy tengely működésének precíz vizsgálatát.

Témavezető: Dr Fekete Csaba



**Kerti Margit Katalin, ÁOK VI**

Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet, Budapest

### **Patkány szaglógumó mély rövid-axonú sejtjeinek neurokémiai jellemzése**

A szaglógumó mély rövid-axonú sejtjei a GABAerg interneuronok egy olyan különleges csoportját képezik, amelyek szelektíven más interneuronokon szinaptizálnak. Korábbi neurokémiai kísérletek, neuropeptidok és kalcium-kötő fehérjék immunhisztokémiai kimutatásával azt jósolták, hogy ezek a sejtek igen kis számban fordulnak elő a szaglógumóban. Laborunk munkatársai korábban három különböző mély rövid-axonú sejt létezését írták le a szaglógumó szemcsesejt rétegében, és azokat axonfájuk elhelyezkedésének függvényében nevezték el, GL-, GCL- és EPL- típusú mély rövid-axonú sejteknek (Eyre és mts, 2008, J Neurosci, 28, 8217-8229). Kísérletünk során célunk a mély rövid-axonú sejtek molekuláris tulajdonságainak a jellemzése ennek tükrében pedig a különböző neurokémiai markerek által jellemezhető sejtpopulációk közötti átfedés feltérképezése illetve sztereológiai módszerek (Cavalieri tétele) segítségével az összes mély rövid-axonú sejtek számának meghatározása. Hím Wistar patkányokat transzkardiálisan perfundáltunk 4%-os paraformaldehid és 15v/v%-os pikrinsav tartalmú fixálóval. Az eltávolított szaglógumóból vibratom (VT1000S; Leica Microsystems) segítségével 60 $\mu$ m vastagságú horizontális metszeteket készítettünk. Kísérletünkben kettős jelölésű fluoreszcens technikákat alkalmaztunk különböző elsődleges ellenanyagok felhasználásával. Az immunreakciókat Olympus BX62 epifluoreszcens valamint Olympus FV1000 konfokális lézer pásztázó mikroszkópok segítségével elemeztük. Eredményeink azt mutatják, hogy a patkány szaglógumójában megközelítőleg tizenháromezer mély rövid-axonú sejt van, amelyek jellemezhetőek egy vagy akár egyszerre két neurokémiai markerrel. Az interneuron populáció számottevő részét a GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha$ 1 alegységet (GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1), illetve a feszültség-függő kálium csatornák közül a Kv2.1 és a Kv4.3 alegységet kifejező neuronok képezik. Ennek ellenére csupán a GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1 neurokémiai marker tekinthető sejtspecifikusnak, minthogy az utóbbi két markert a szemcsesejtek is kifejezik. A Kv3.1b alegység a mély rövid-axonú sejtek közel háromnegyedét jelöli, de nem jelöl szemcsesejteket. Összehasonlítva a már korábban leírt markereket (VIP, calbindin, nitric oxide synthase, szomatosztatin és m2 muszkarin receptor) a GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1 immunopozitív interneuron alcsoporttal, azt találtuk, hogy ezek a markerek igen kis hányadát jelölik a mély rövid-axonú sejteknek. Megközelítőleg a mély rövid-axonú sejtek egynegyede immunopozitív az mGluR1a receptorra és nagyrészt a belső plexiform rétegben helyezkednek el. In vitro agyszleteken végzett 'egész sejt konfigurációval' történő elvezetés után azonosított mély rövid-axonú sejteken végzett immuncitokémiai jelölések azt bizonyították, hogy a mGluR1a immunopozitív sejtek valószínűleg GL típusú mély rövid-axonú sejtek. Összegezve azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a korábbi feltételezésekkel szemben a mély rövid-axonú sejtek relatív nagy számban vannak jelen a patkány szaglógumó szemcsesejtrétegében, és molekulárisan egy igen heterogén neuroncsoportot képeznek. Molekuláris változatosságuk arra utal, hogy ezek az interneuronok különböző szerepet töltenek be a szaglógumó dinamikus működésének szabályozásában.

Témavezetők: Dr. Mark D. Eyre, Dr. Nusser Zoltán

### **Glutamát jelátvitel markereinek tanulmányozása patkány hipofízisben**

A glutamát az agy neuronjainak mintegy felében megtalálható, legfontosabb serkentő neurotranszmitter. Szinaptikus ürülése előtt vezikulákba csomagolódik vezikuláris glutamát transzporterek (VGLUT) segítségével. Az agyban az ürülő glutamát visszavételét a serkentő idegsejtek nagyrészt nem közvetlenül végzik, az ürített glutamát zöme asztroglia sejtekbe kerül. A glia sejtekben a glutamát glutaminná alakul a glutamin szintetáz enzimreakció révén.

A vezikuláris glutamát transzporternek három molekuláris formája létezik VGLUT1-3, melyek funkciójuk miatt glutamát markernek tekinthetők. A glutamát funkcionális jelentősége az adenohipofízisben még kevésbé ismert, azonban idegi előfordulásán túl munkacsoportunk adenohipofízisben is kimutatta a VGLUT2 izoforma a megjelenését<sup>1</sup>. Kolokalizációs vizsgálatok során a VGLUT2 jelenlétét hipofízis elülső lebenyének TSH, FSH LH sejtjeiben tárták fel. Ezen kívül az adenohipofízis VGLUT2 mRNS expressziója hormonstátuszról való függést mutatott, ami a glutamáterg jelátvitel funkcionális jelentőségét sugallta.

Ezen korábbi eredményekből kiindulva tovább vizsgáltuk a glutamáterg jelátvitel enzimjeinek meglétét az adenohipofízisben. Célunk további VGLUT izoformák megjelenésének vizsgálata, és differenciális eloszlás esetén viszonyuk feltárása glutamáterg endokrin sejtekkel. Ezen túl, az agyban a glutamát-glutamin átalakulásért felelős, de hipofízisben már szintén leírt, glutamin szintetáz (GS)-t tartalmazó sejtek eloszlását, és VGLUT fenotípusú, glutamáterg mirigysejtekhez való viszonyát vizsgálatuk. Izgalmas kérdés, hogy a glutamin/glutamát ciklus az agyalapimirigyben is hasonlóan működik-e az idegszövetihez, amelyben az asztroglia funkciókat a folliculostellate sejtek látnák el. A VGLUT izoformák és glutamin szintetáz hipofízisbeli lokalizációjának vizsgálatához patkány modellt használtunk. Felnőtt, hím transzkardinalisan perfundált patkányok szöveteiből 20 mikronos metszeteket készítettünk és ezeken immunperoxidáz és kettős immunfluoreszcens festéseket alkalmaztunk. Az immunfluoreszcens vizsgálatok eredményének kiértékelése és archiválása konfokális mikroszkóppal történt. Három-három egyedből származó patkány metszettel végeztünk párhuzamos kísérleteket és végeztük el a kolokalizációs százalékok számolását.

Az egyes VGLUT izoformák jelenlétét két-két különböző antitesttel is sikerült kimutatni, megerősítve ezzel az immunjelek specifikusságát. A VGLUT1 jel specificitását, két különböző antitest egyidejű használatával is bizonyítottuk, mivel a kétféle jel ugyanazon sejtek kettős-immunreaktivitását igazolta. A további kettős-fluoreszcens vizsgálataink arra a kérdésre kerestek választ, hogy a VGLUT1 mely trófhormon termelő sejttypus(ok)-ban jelenik meg, a VGLUT3 esetén a kimutatás viszonylagos érzéketlensége nem tette ezt lehetővé. A VGLUT1 termelő sejtek nagy része kortikotróp sejt volt, kis része gonadotróp. Feltételezzük, hogy a hipofízisben is ürülhet glutamát a VGLUT tartalmú sejtekből. Jelen munkánk vizsgálta továbbá, hogy a folliculostellate sejtek viszonylag kis hányadát képező GS tartalmú sejtek milyen morfológiai viszonyban állnak a VGLUT tartalmú sejttypusokkal. Konfokális mikroszkóppal megfigyeltük a GS tartalmú folliculostellate sejtek közvetlen kontaktusát a VGLUT2-t is termelő TSH, FSH és LH sejtekkel. Nem volt megfigyelhető az FS sejtek hasonlóan szoros kapcsolata egyéb sejttypusokkal, így GH és ACTH sejtekkel. Mindebből arra következtettünk, hogy a GS-nek a hipofízisben is fontos szerepe lehet a glutamát recirkulációjában.

Témavezető: Dr. Hrabovszky Erik

### **Kurucz Péter ÁOK III**

Neuromorfológiai és Neuroendokrin Kutatócsoport, MTA-SE, Anatómiai Intézet, Budapest

#### **Az éhezés és jóllakottság neuron aktiváló hatása az alsó agytörzsben gold-thioglucoze kezelést követően**

Az elhízás a fejlett országokban népbetegségnek számít, ezért a táplálékfelvétel központi szabályozó mechanizmusainak pontos ismerete alapvető fontosságú. A gold-thioglucoze-ról (GTG) leírták, hogy egerekbe injektálva elhízást okoz, melynek oka a hypothalamus ventromedialis (VM) magjában létrejövő sejtpusztulás. Kutatócsoportunkban korábban részletesen vizsgálták a VM magban bekövetkező változások táplálékfelvételre gyakorolt hatását. Ismert, hogy a GTG kezelés nemcsak a hypothalamusban, hanem az area postrema körül is hegyszövet képződéshez vezet, ez sejtpusztulást okoz az area postremával idegi összeköttetésben lévő agytörzsi vagus komplex területén is. Jelenlegi munkám során azt vizsgáltam, hogy a GTG kezeléssel kiváltott sejtpusztulás és hegyszövet képződés, milyen hatással van többnapos éhezés, illetve éhezést követő újraetetés után az agytörzsi vagus komplex neuronjainak aktiválódására. Kísérleteimből nyert információk hozzájárulhatnak az agytörzs táplálékfelvétel központi szabályozásában játszott szerepének jobb megértéséhez.

Vizsgálataimat 18-20g súlyú egereken végeztem. Az állatoknak egy alkalommal éhgyomorral, intraperitonealisan GTG-t adtam. A kezelést követő 15. napon az állatok egy részétől megvontam a táplálékot, de a folyadék továbbra is szabadon elérhető volt számukra. Két nap éhezés után az állatok egy kisebb csoportjának elkülönítve újra adtam élelmet. A GTG kezelt állatok kontrolljaként nem kezelt egereket használtam, melyeket szintén éheztetett és éheztetett - újraetett csoportokra osztottam. Az állatokat 48 órás éheztetés (plusz 2 órás újraetetés) után transcárdialis perfúzióval fixáltam. Az agytörzsből coronalis metszeteket készítettem, melyeken az éheztetés illetve újraetetés hatására létrejött neuronaktiváció detektálására c-Fos immunhisztokémiai reakciót végeztem. A GTG kezelés hatásának megállapításához az area postrema legnagyobb kiterjedésének szintjében lévő metszeteken a vagus komplex területén planimetriát végeztem. Az egyes magok c-Fos pozitívitásának mértékét is ebben a magasságban határoztam meg. A planimetria során kimutattam, hogy GTG kezelést követően a nucleus tractus solitarii (NTS), nucleus motorius dorsalis nervi vagii (DMV) és az area postrema (AP) területe szignifikánsan csökkent. A c-Fos immunreakcióval a GTG kezelt állatokban éhezést követően a DMV-ben és az AP-ban találtunk pozitív sejteket, míg az NTS-ben nem található jelölődés. A nem kezelt, éheztetett állatokban erősebb a c-Fos pozitívítás. A GTG kezelt éheztetett, majd újraetett állatokban számos c-fos pozitív sejt detektálható az NTS és az AP területén, míg ebben az esetben a DMV területén nem látható jelölődés. A c-Fos pozitívítás ezekben az állatokban gyengébb mint az újraetett, de nem kezelt állatok esetében.

Ezek alapján elmondható, hogy az éhezés során erősen aktiválódó, fokozott gyomorsav szekrécióért felelős DMV és a keringő hormonok számára nyitott AP területén GTG kezelés hatására csökken az aktiváció. Kezelés nélkül, újraetetését követően a jóllakott állapotban számos sejt aktiválódása mutatható ki szintén az AP és a nervus vagus felől afferens információkat kapó NTS területén, mely GTG kezelést követően szintén csökkent aktivitást mutat. További vizsgálatok során tervezem az aktiválódó neuronokban expresszálandó neuropeptidok kimutatását

-Meltzer et al.: *Feeding- and refeeding-induced neuronal activity in the hypothalamus of gold thioglucoze-treated mice*, Magyar Idegtudományi Társaság 2007. évi konferenciája, Szeged

-Kurucz et al.: *Hypothalamic, Limbic and Medullary Innervation of the Stomach and the Duodenum in Vagotomized Rats*. Clin Neurosci/Ideggy Szle 2007 60/1:38

Témavezető: Dr. Palkovits Miklós

**Léránt Éva ÁOK V.**

Semmelweis Egyetem Neurológiai Klinika, Budapest

### **Parkinsonos és esszenciális tremor elkülönítése a tremor és mozgáskoordináció jellemzői alapján**

**Célkitűzés:** A tremor a leggyakoribb mozgászavar, legtöbbször esszenciális tremor (ET) vagy Parkinson-kór (PT) tünete. Kifejlődött betegségekben a tremorok elkülönítése nem okoz gondot, a kezdeti stádiumban azonban a differenciálás nehéz lehet. Irodalmi adatok alapján az ET diagnózisa az esetek harmadában, PT esetén közel negyedében téves. Vizsgálatunk során statisztikai módszerekkel értékeltük 25 tremor és mozgáskoordinációs változó diszkriminatív képességét egyenként illetve kombinálva.

**Módszerek:** egészséges (n=41), Parkinson-kórban (n=43) és esszenciális tremorban (n=42) szenvedő személyeket vizsgáltunk CATSYS mérőmódszerrel. A tremor fő elektrofiziológiai jellemzőit, a pronáció-szupináció és ujjdobolás ritmusosságát és maximum frekvenciáját valamint a reakcióidőt határoztuk meg mindkét kézen. A két kéz adatait az erősebben ill. kevésbé remegő oldal szerint csoportosítottuk. 11 mért és 14 számított változót értékeltünk diszkrimináció analízissel.

**Eredmények:** A fiziológiás-, az esszenciális- és Parkinsonos tremort legjobban elkülönítő változónak a kevésbé remegő kéz frekvencia diszperzióját találtuk, melyet a kevésbé remegő kéz maximális frekvenciája és az ujjdobolás ritmustrartása követett. Egyetlen változó segítségével csak gyenge diszkriminációt értünk el (helyes besorolás: 55% PT, 66% ET, 88% egészségesek esetén). A változók csoportosításával a diszkrimináció javult. A legjobb eredményt 16 jellemző kombinációja adta (helyes besorolás: PT:95%, ET: 86%, egészségeseknél: 98%). További jellemzők bevonása nem javította a modell elkülönítő képességét.

**Következtetés:** Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy az egyedi tremor ill. mozgáskoordinációs jellemzők önálló diszkriminatív képessége gyenge, mindössze a pathológiás ill. fiziológiás tremor elkülönítését teszik lehetővé. A változók kombinálásával azonban az esszenciális tremorban ill. Parkinson-kórban szenvedő betegek csoportjai több mint 85 %-os valószínűséggel megkülönböztethetők. A statisztikai módszerrel kiegészített diagnosztikai algoritmus felhasználható a klinikai differenciáldiagnózisban.

Munkacsoportunk először vezette be Magyarországon a CATSYS mérőrendszert, mely lehetővé teszi a tremor és mozgáskoordináció gyors és pontos mérését. A módszert korábban foglalkozás-egészségügyi vizsgálatokban használták, Parkinsonos és esszenciális tremorban szenvedő személyeket nem vizsgáltak vele. Korábbi vizsgálatunk során (1) megállapítottuk, hogy a rendszer alkalmas klinikai körülmények között a két betegcsoport vizsgálatára. Leírtuk a két tremor típus elektrofiziológiai jellemzőinek különbségeit (2). Kimutattuk, hogy esszenciális tremorban cerebelláris károsodásra utaló ritmustrartási zavar észlelhető (3). Jelen vizsgálatunkban először bizonyítottuk statisztikai módszerekkel, hogy a tremor és mozgáskoordináció jellemzőinek megfelelő kombinációjával felépített modell felhasználható a mindennapi klinikai differenciáldiagnózisban.

1. Farkas Z. Csillik A. Palvolgyi L. Takacs A. Szirmai I. Kamondi A. Complex tremor analysis for the differential diagnosis of essential tremor and Parkinson's disease. *Ideggyógyászati Szemle* 2006 (59): 45-54.

2. Farkas Z. Csillik A. Szirmai I. Kamondi A. Asymmetry of tremor intensity and frequency in Parkinson's disease and essential tremor. *Park Rel Dis* 2006(12):49-55.

3. Farkas Z. Szirmai I. Kamondi A. Impaired rhythm generation in essential tremor. *Mov Dis* 2006 (21): 1196-9.

Témavezető: Prof.Kamondi Anita

### **Fagyasztásos lézió utáni érreakciók vizsgálata patkány agyban**

A fagyasztásos lézióval az agyszöveten úgy tudunk sérülést létrehozni, hogy közben a durát, ill. az agyfelszíni glia limitanst nem törjük át (fedett sérülés). Jelen munkákban a sérülés nyomán kialakuló glia- és érreakciókat vizsgáltuk azért, hogy alkalmas-e ez a modell az esetleges revaszkularizáció vizsgálatára. A gliareakciót, a lamina basalis változásait, illetve a gliovascularis kapcsolatokat immunhisztokémiai markerekkel vizsgáltuk. A műtéteket altatott patkányokon végeztem (0,1 ml ketamin+ 0,2 ml xylazin/ 100g i.m.). Egy szárazjég-aceton keverékben hűtött rézrudat használtam, amely sztereotaxiás berendezéshez volt erősítve a lézió pontos lokalizációjára. A sutura coronaria mögött, jobb oldalon eltávolítottam egy 5x 5 mm-es koponyacsont-darabot, és a rézrudat ide helyeztem. Különböző tartamú (10, 20, 30 sec) fagyasztásokat vizsgáltam. A művelet után a kivett csontdarabot visszahelyezve zártam a koponyát. Az állatokat 2, 4, 7, 14, ill. 30 napos túlélés után perfundáltam 4%-os paraformaldehiddel, majd az agyakat 2 napig utófixáltam. Vibratómmal 100 µm-es szeleteket készítettem, melyeket a primer antitestekkel 4 °C-on 2 napon át inkubáltam, majd az immunreakciót fluoreszcens módszerrel tettem láthatóvá. A gliareakciókat a nestin és a GFAP-elleni immunreaktivitásának segítségével követtük, a lamina basalist a laminin, míg a gliovascularis kapcsolatok a dystroglycan és társult fehérjéi (utrophin, syntrophin, dystrophin, dystobrevin) immunfestésével vizsgáltuk. A reaktív gliózist GFAP és nestin pozitivitás kísérte. A glia és érreakciók hevessége és kiterjedtsége nőtt a fagyasztás időtartamával. A léziót követően az erekben lévő laminin immunoreaktívvá vált, míg az ép agyban meglévő dystroglycan pozitivitás eltűnt. Az egyéb vizsgált anyagok közül ehhez járult még az utrophin immunoreaktivitásának megjelenése, és a dystrobrevinének eltűnése. Megállapíthatjuk, hogy a lézió minél hosszabb ideig tartott, annál hosszabb idő ( 7-30 nap ) volt szükséges az ép agyra jellemző immunfestések visszaállításához. Az eredmények általánosságban hasonlítottak ahhoz, amit korábban szűrásos lézió körül korábban észleltünk (Szabó és Kálmán 2004, 2008), bár a mi esetünkben az utrophin elváltozásai gyengébbeknek tűntek. Az irodalmi adatok és korábbi vizsgálatainkkal összevetve feltételezhetjük, hogy a erekben meglévő laminin immunoreaktívvá válása (azaz detektálhatósága), ill. a dystroglycan eltűnése az erek és gliovascularis kapcsolatok károsodásának közvetett jele. Eredményeinket felhasználhatjuk különböző beavatkozásoknak a gliovascularis kapcsolatok helyreállításában játszott szerepének vizsgálatához. Hasonló témában a munkacsoportunkban megjelent közlemények:

Szabó A, Kálmán M Disappearance of the post-lesional laminin immunopositivity of brain vessels is parallel with the formation of gliovascular junctions and common basal lamina. A double-labeling immunohistochemical study. *Neuropath Appl Neurobiol* (2004) 30:169-170

Szabó A, Kálmán M (2008) Post traumatic lesion absence of  $\beta$ -dystroglycan immunopositivity in brain vessels coincides with the glial reaction and the immunoreactivity of vascular laminin. *Curr Neurovasc Res*, 5: 206-213, amelyek azonban nem fagyasztásos, hanem szűrásos lézióval foglalkoztak.

Témavezető: Dr. Kálmán Mihály

**Marics Gábor ÁOK VI**

Semmelweis Egyetem/Pázmány Péter Katolikus Egyetem MR Kutató Központ, Budapest

### **Kapszaicin szenzitizáció hatása a fájdalom percepcióra**

A kísérletnek az a célja, hogy megvizsgálja egészséges emberek szubjektív fájdalom percepcióját kapszaicin kezelés előtt és után, vizsgált paraméterek: szubjektív fájdalomérzet intenzitása és a fájdalom ingert követő reakcióidő.

A kapszaicin szenzitizáció az irodalomból jól ismert protokoll szerint történik és az ehhez szükséges lokális melegítő berendezést, (amely kontroláltan 45 °C – os hőmérsékletre melegíti a bőrt az ingerlés helyén) megterveztem és elkészítettem. Kalibrálható, és programozható mechanikus fájdalomingerlő készülék, amely egy tompa tű segítségével ingerli a bőrt, rendelkezésemre állt. A kísérlet során először az alanyak egy egér segítségével azt kell eldöntenie, hogy fáj-e az adott inger, majd ezt követően egy csúszka segítségével meghatározza, hogy mennyire fáj az inger. A vizsgálatot mind kapszaicin kezelés nélkül és kapszaicin kezeléssel el kell végezni. A kísérlethez szükséges informatikai háttér megvalósítása MATLAB fejlesztői környezetben történt. A programok egy része saját fejlesztésem.

Az eddig eredményeink szerint a kapszaicin a különböző erősségű ingerekhez tartozó reakcióidő mintázatot a fájdalomérzethez hasonlóan megváltoztatja, de statisztikai validáláshoz, további vizsgálatok szükségesek, amelyek a beadás idejében még zajlanak.

A hivatkozott cikkben a szerzők a *reakcióidőt* nem vizsgálták.

István Kóbor<sup>1</sup>, Viktor Gál<sup>1,2</sup> & Zoltán Vidnyánszky<sup>1,2</sup> „Attentional modulation of perceived pain intensity in capsaicin-induced secondary hyperalgesia”(Submitted )

Témavezető: Dr. Gál Viktor

**Neubrandt Máté ELTE TTK**

MTA KOKI Idegi Sejt és Fejlődésbiológia Laboratórium

### **EAAT4 glutamát transzporter idegi ősz- és progenitor sejteken**

A glutaminsav a központi idegrendszer legjelentősebb neurotranszmittere, extracelluláris szintje szigorú szabályozás alatt áll. Ezt a szabályozást a plazmamembrán glutamát transzporterek végzik, amelyeknek öt tagja ismert (GLAST, GLT1, EAAC1, EAAT4, EAAT5). A transzporterek kifejeződése sejt típusonként és agyterületenként változó.

Laboratóriumunkban az idegi sejt differenciáció alapvető folyamatait tanulmányozzuk elsősorban *in vitro* modellrendszereken (NE-4C, P19 sejt vonal). Eredményeink szerint a GLAST és EAAT4 transzporter mRNS-e fejeződik ki legkorábban, kimutathatóak már a neurális őssejteken is. A GLAST korai expressziója az irodalomban jól ismert, az EAAT4 ilyen korai, embrionális fejlődés alatti jelenlétét azonban eddig nem mutatták ki. Az EAAT4 kifejlett idegrendszerben kisagyi Purkinje sejtekre, GABAerg interneuronokra, valamint asztroglia sejtek bizonyos csoportjaira és a retinára jellemző.

Munkám során az EAAT4 kifejeződését vizsgáltam az idegi sejt fejlődés során, *in vivo* és *in vitro*. Az expresszálódó fehérje kimutatására Western blotot alkalmaztam. *In vivo* előfordulását embrionális és perinatális egér ill. patkány metszeteken végzett immunhisztokémiai festésekkel analizáltam. Az EAAT4 pozitív sejtek azonosítását különböző sejt típus specifikus markerekkel végzett kettős festésekkel végeztem. A transzporter működését triciált glutamát felvétel méréssel igazoltam.

Az EAAT4 fehérje kifejeződését Western blot analízis igazolta mind NE-4C és P19 idegi őssejteken, mind egér embrionális előagyi mintában. Továbbá, a GLAST működésének gátlása mellett EAAT4 specifikus glutamát felvétel mérhető az idegi őssejtekben. *In vivo* embrionális fejlődés során kimutatható a transzporter az agy neurogén régióiban. Ezekben a területeken az EAAT4 specifikus festődés kirajzolja a neurális őssejtként funkcionáló radiális gliasejteket. Újszülött állatban pedig az asztroglia progenitor sejtek bizonyos csoportjain detektálható az EAAT4 transzporter.

Munkám során tehát igazoltuk az EAAT4 glutamát transzporter jelenlétét ősz- és progenitor sejteken, szerepe azonban még tisztázásra vár. A glutamát felvétel mérésekből kiderült, hogy az EAAT4 transzporter aktivitását meghaladja a GLAST transzport aktivitása. Ugyanakkor tudjuk, hogy az idegi progenitorsejtekre magas intracelluláris kloridion koncentráció jellemző és az EAAT4 transzporter működését jelentős kloridion konduktancia jellemzi. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a neurális ősz- és progenitorsejteken az EAAT4 transzporternek inkább a kloridion háztartás szabályozásában lehet szerepe, mint az extracelluláris glutamát koncentráció szabályozásában.

Témavezető: Dr. Jelítai Márta

### **Különböző Eredetű Óriás Serkentő Terminálisok Eloszlása és Konvergenciája Patkány Somatosensoros Thalamusában**

A thalamicus neuronok (relésejtek) működését alapvetően óriás, serkentő terminálisok ún. irányító (driver) bemenetek határozzák meg. Ezek eredete alapján a thalamus magok két csoportra oszthatók: elsőrendű magokra, melyek subcorticalis központokból kapnak óriás, serkentő terminálisokat, és magasabbrendű magokra, melyek a corticalis ötödik rétegi piramis sejtektől kapnak irányító bemenetet. Subcorticalis irányító bemenet a magasabbrendű magokba is érkezik. Ez az alábbi, eddig meg nem válaszolt kérdéseket veti fel:

1. Hogyan oszlanak el a magasabbrendű magokba érkező corticalis és subcorticalis eredetű óriás, serkentő terminálisok egymáshoz képest?
2. Mennyire hasonlóak ultrastrukturális tulajdonságaikban és célelem szelektivitásban?
3. Van-e olyan thalamicus relésejt, amely egyszerre kap kérgi és kéreg alatti irányító bemenetet?

A tanulmányban a patkány thalamus magasabbrendű somatosensoros magjával (nucleus posterior, Po) foglalkozom. A két különböző eredetű „driver” egymáshoz viszonyított eloszlásának vizsgálatához, anterográd pályajelölő anyagot juttatunk az S1 somatosensoros kéregbe, míg a perifériás terminálisok jelölésére, azok szelektív markerét; a vezikuláris glutamát transzporter 2-es típusú fehérjét (vGlut 2) alkalmaztuk. A kérgi terminálisokat nikkell-intenzifikált diamino-benzidinnel, a perifériásakat diamino-benzidinnel jelenítettük meg. Fénymikroszkópos analízis során a Po-ban perifériás terminálisban (vGlut 2+) gazdag és ritka területeket definiáltunk. Ehhez viszonyítottuk a kérgi terminálisok elhelyezkedését. A fénymikroszkópos vizsgálatokat elektronmikroszkópos analízis követte.

Eredményeink azt mutatják, hogy a perifériás terminálisok eloszlása a Po-ban foltszerű. Egyes területeken sűrűn, másokon ritkán fordulnak elő, illetve vGlut 2+ terminálisoktól mentes területeket is megfigyeltünk. A kérgi terminálisok eloszlása szintén foltszerű volt. A kérgi óriás, serkentő terminálisok jelentős része fordult elő vGlut 2+ terminálisban gazdag területen. Emellett megfigyelhetőek voltak perifériás terminálisban ritka és azoktól mentes területen is. A kérgi óriás butonok sem teljes szelektivitást, sem teljes elkerülést nem mutattak a perifériás terminálisban gazdag területek iránt.

Az elektronmikroszkópos vizsgálatok azt bizonyítják, hogy a két különböző eredetű terminális ultrastrukturálisan egyenrangúnak tekinthető, és célelem szelektivitásuk is hasonló. Mindkét típus több szinapszt képez a relésejtek vastag proximális dendritjeivel, melyek a terminálisba ujjszerűen betűrődve növelik a szinaptizáló felületek nagyságát. Az elektronmikroszkópos vizsgálatok továbbá bizonyítják, hogy ugyanazon relésejt egyszerre kaphat kérgi és perifériás irányító bemenetet, tehát a konvergencia létező jelenség.

Adataink alapján arra következtethetünk, hogy a magasabbrendű magokba érkező kétféle „driver” bemenet hasonló anatómiai szerveződésű, jelenlétük egyformán meghatározó a somatosensoros működés szempontjából, amit a laboratóriumunkban folyó párhuzamos *in vivo* elektrofiziológiai vizsgálatok is megerősítenek. Továbbá, eredményeink a thalamus relé funkciója mellett rávilágítanak egy új típusú, különböző eredetű információk integrálásán alapuló működésre, melynek alapja két különböző eredetű driver konvergenciája egy sejten.

Csoportunk eddigi munkája során a magasabbrendű magokba futó szelektív gátló rostok anatómiai és elektrofiziológiai jellemzésével foglalkozott (Bodor et al. 2008 J Neurosci. 28:3090-102; Wanaverbecq et al. 2008 J Neurosci. 28:11848-61; Lavallée et al. 2005 J Neurosci. 25:7489-98; Bokor et al. Neuron. 2005 45:929-40). Jelen tanulmány ezen túllépve a magasabbrendű magvak serkentő bemeneteinek morfológiáját vizsgálja.

Témavezető: Dr. Acsády László



**Varga Anett, Mucsi Orsolya, ÁOK VI.**

MTA-Semmelweis Egyetem Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet Neuromorfológiai és Neuroendokrin Kutatócsoport

### **$\beta$ -arrestin-függő jelátviteli mechanizmusok szerepe a prolaktin elválasztás fiziológiás szabályozásában**

A közelmúltban Beaulieu és munkatársai kimutatták, hogy a corpus striatumban lévő dopamin (DA)  $D_2$ -receptoroknak tartós, ún. tónusos stimulálása  $\beta$ -arrestin<sub>2</sub>/Akt/Protein-foszfataz 2A (PP2A) komplex képződéséhez vezet, amely a  $\beta$ -arrestin<sub>2</sub> ismert, deszenzitizációban játszott szerepe mellett felvetette egy új jelátvivő mechanizmus létezését. E komplexben a PP2A defoszforilálja, ill. inaktiválja az Akt-ot, és ezen keresztül befolyásolja a glikogén szintetáz-kináz  $\alpha/\beta$  (GSK $\alpha/\beta$ ) aktivitást. Az elmúlt évben beszámoltunk arról, hogy az agyalapi mirigy elülső lebenyében a mamotrop sejteken található  $D_2$ -es receptorok tónusos stimulálása során ez a jelátvivő mechanizmus ugyancsak funkcionál. Vizsgálataink során hím patkányokban specifikus,  $D_2$ -receptor-antagonista haloperidol (HAL), raclopride (RAC) és a DA bioszintézisét gátló alfa-metil-para-tirozin ( $\alpha$ MpT) szisztémás beadásával létrehozott elülső lebenyi DA megvonást követően kimutattuk, hogy az aktív Thr308-foszfó-Akt (P-Akt) mennyisége jelentősen fokozódik. Ezzel párhuzamosan a plazma prolaktin szintek is megemelkedtek, amely egybehangzóan mutatja az említett szignálmechanizmus tónusos gátló szerepének jelenlétét. Felvetődik a kérdés, hogy ez a mechanizmus fiziológiás körülmények között is fennáll-e.

Nőstény patkányokon szopási stimulust alkalmazva hypophysis elülső lebenyi homogenizátumokból western-blottal totál-Akt, P-Akt és P42/44-MAP-kináz (ERK1/2) mennyiségét határoztuk meg az idő függvényében. A szoptatás és a farmakológias kezelés hatékonyságát plazma prolaktin meghatározással (RIA) ellenőriztük.

Szopási stimulust követően laktáló állatokban már a 10. percben az Akt és az ERK1/2 fokozott foszforilációja volt kimutatható, amely még a 60. percben is fennállt. Annak eldöntésére, hogy mindkét fehérje foszforilációja szükséges-e a szopási inger hatására létrejövő plazma prolaktin szintjének emelkedéséhez, a MAPK szelektív gátlószerét (SL327) alkalmaztuk. SL327 hatására azonban nem találtunk változást a hormonválaszban. Ez arra utal, hogy a MAPK foszforilációja valamely más, ugyancsak a szopási inger hatására létrejövő mechanizmusban játszik szerepet. A szignál-komplex szétkapcsolódásának hatását a plazma prolaktin szintre a PP2A gátló okadánsav intracerebro-ventricularis beadásával is igazoltuk.

A korábban már megismert, döntően in vitro adatokon alapuló, DA hatására bekövetkező intracelluláris cAMP/AC/PKA gátlás in vivo alárendelt szerepét azzal támasztottuk alá, hogy HAL ill.  $\alpha$ MpT szisztémás beadását követően a szöveti cAMP mennyiségében változást nem tapasztaltunk.

Mindezen eredmények hozzájárulhatnak a tónusos DA-erg gátlás, valamint a hypophysis sejteiben zajló túlélési- és apoptotikus mechanizmusok részletesebb megismeréséhez, továbbá a humán hypophysis tumorok hatékonyabb kezeléséhez is.

Témavezetők: Dr. Nagy M. György, Dr. Oláh Márk

### **A gamma oszcilláció kialakulása a hippocampusz CA1 régiójában**

A hippocampusz jellegzetes viselkedésfüggő aktivitásmintázatai közül a gamma oszcillációnak (30-100 Hz) a memória tárolásában és előhívásában tulajdonítanak szerepet, kialakulásának hátteréről azonban még keveset tudunk. Az *in vivo* és *in vitro* mérések azt igazolják, hogy bizonyos körülmények között a hippocampusz CA3 régiójában kialakuló ritmikus aktivitás vezérli a CA1 régióban megfigyelhető szinkron mintázatokat, de az oszcilláció áterjedésének mechanizmusa még nem ismert. A CA3 régió ritmikus aktivitásának celluláris háttere *in vitro* módszerekkel már kutatott, a CA1 régióban kialakuló oszcillációt azonban ilyen körülmények között még nem vizsgálták. Munkánk során arra kerestük a választ, hogy miként valósul meg a CA3 régió által generált oszcilláció áterjedése a CA1 régióba. Ennek felderítéséhez nélkülözhetetlen az egyes sejttípusok bemeneti és kimeneti tulajdonságainak leírása az oszcilláció alatt.

Méréseink során *in vitro* elektrofiziológiai módszereket használtunk. Túlélő agyszelet preparátumon vizsgáltuk a CA3 és CA1 régió sejttípusainak viselkedését kolinerg agonista (karbakol) indukálta gamma oszcilláció alatt. A vizsgálatok során egy lokális elektródot helyeztünk a CA1 régióba a lokális mezőpotenciál-változás vizsgálatára, egy másik elektróddal megfigyeltük az egyes sejtek által generált akciós potenciálokat, majd *whole-cell* elvezetésben detektáltuk a sejtekre érkező serkentő és gátló szinaptikus áramokat. A *whole-cell* mérések során használt intracelluláris oldat biocytint tartalmazott, így a szeletek fixálása után immuncitokémiai módszerekkel láthatóvá tettük a sejteket, melyek sejttípusát morfológiai jellemzőik alapján azonosítottuk. Az analízis során a sejtek tüzelését és a rájuk érkező szinaptikus áramokat viszonyítottuk a lokális mezőpotenciál-oszcilláció fázisához.

A kapott eredmények azt mutatják, hogy a CA1 piramissejteknek csak a fele volt fáziskapcsolt, ezek az oszcilláció negatív csúcsán tüzeltek, míg az interneuronok többnyire fáziskapcsoltan sütké ki az oszcilláció emelkedő szakaszában. A sejtekre érkező serkentés mindig megelőzte a rájuk érkező gátlást, és míg az interneuronokon erős fázikus serkentés volt megfigyelhető, addig a CA1 piramissejteken a fázikus gátlás dominált. A CA3 piramissejtekhez képest a CA1 piramissejtek valamivel előbb, míg a CA3 és CA1 interneuronok egy monoszinaptikus kapcsolatnak megfelelő késéssel tüzeltek. Ezen adatok alapján felállítható egy modell, mely szerint a gamma oszcilláció során a CA3 piramissejtek fázikus serkentése határozza meg a CA3 és a CA1 gátlósejtek kisülését, míg a CA1 piramissejtek tüzelési mintázatát a CA1 interneuronokból érkező fázikus gátlás szabja meg.

Mivel a sejtek tüzelési sajátságai megfelelnek az *in vivo* mérések során tapasztaltaknak, feltehető, hogy ez az *in vitro* modell jól jellemzi az intakt agyban lejátszódó folyamatokat, így lehetőséget biztosít az oszcillációk olyan vizsgálatára, amelyre *in vivo* mérések során nincsen lehetőség, mint például további elektrofiziológiai és farmakológiai vizsgálatok.

Csoportunk a témában két cikket publikált a CA3 sejtek működéséről:

Hájos N, Pálhalmi J, Mann EO, Németh B, Paulsen O, Freund TF (2004) Spike timing of distinct types of GABAergic interneuron during hippocampal gamma oscillations *in vitro*. *J Neurosci* 24:9127-9137.

Oren I, Mann EO, Paulsen O, Hájos N (2006) Synaptic currents in anatomically identified CA3 neurons during hippocampal gamma oscillations *in vitro*. *J Neurosci* 26:9923-9934.

Az általam vizsgált CA1 régió sejtjeinek sajátságai még nem kerültek publikálásra.

Témavezetők: Dr. Hájos Norbert, Zemankovics Rita

**Vőfély Gergő ELTE-TTK Biológus V. évf.**

MTA-KOKI, Idegi Sejt- és Fejlődésbiológiai Laboratórium, Budapest

### **Retinsav a posztnatális központi idegrendszerben**

Az *all-transz* retinsav (RA) az A-vitamin (retinol, ROL) biológiailag aktív származéka. E morfogén molekula kiemelkedő szereppel bír a központi idegrendszer és a normális szervfejlődés irányításában, valamint időben és térben mind embrionális mind posztnatális korban meghatározott mintázat szerint termelődik. *In vitro*, a RA képes az el-nem kötelezett őssejtek (embrionális őssejtek, idegi őssejtek) idegi irányú differenciálódását indukálni. Megmutattuk [Környei és mts. 2007, FASEB J. 21(10):2496-509], hogy a tenyésztett asztroglia sejtek jelenlétében az őssejtek neuronális differenciációs programja beindul, s ennek oka az asztroglia sejtek RA termelése. Célkitűzésem a RA reszponzív és RA termelő sejtek azonosítása volt posztnatális egér és patkány agyszövetében, valamint az asztroglia sejtek retinoid raktározó és metabolizáló képességének vizsgálata *in vitro*, A-vitamin mentes modelleken.

*In vivo*, RA-riporter transzgénikus egértörzsből (RARE-LacZ) a retinsav indukálta  $\beta$ -galaktozidáz enzim lokalizációja kirajzolja a RA-reszponzív és a potenciális RA-termelő sejt-populációkat. Ez két módon mutatható ki, egyrészt a  $\beta$ -gal enzim X-gal mesterséges szubsztrátjával másrészt direkt immuncitokémiai jelölésével. *In vivo*, az agy RA eloszlása nem egyenletes – endogén RA főként két kiemelt régióban lokalizálódik, melyek a felnőttkori idegsejtképzésre alkalmas területek. E neurogén zónákban – szubventrikuláris zóna (SVZ) és a hippocampus szubgranuláris zónája (SGZ) – az idegi őssejtek mikrokörnyezetének legfontosabb komponensei az asztroglia sejtek. Feltételezésem szerint e régiók asztroglia sejtjei RA-termelésük révén részt vesznek a felnőttkori idegsejtképzésben. RA-reszponzív és/vagy RA-termelő régióknak bizonyult továbbá az agyhártya valamint az oldalkamrai érfonatok is. Tenyésztett asztroglia sejtekben a RA szintézis kulcsenzimeit (retinaldehid-dehidrogenázok; RALDH2,3) immuncitokémiai festéssel mutattam ki. A különböző agyterületekről származó asztroglia sejtek valamint az agyhártya és az agykamrai érfonatok tényleges RA-termelését egy RA-szenzitív bioassay (F9 RARE-LacZ) segítségével mértem. E retinsav-riporter sejtek aktivált  $\beta$ -gal enzimje hasítja az ONPG mesterséges szubsztrátot így a képződött csapadék optikai denzitása révén kvantálható a termelt RA mennyisége. A ténylegesen RA termelő sejtek az RALDH enzimek expressziójának immuncitokémiai kimutatásával lokalizálhatóak. Posztnatális patkányok agyhártyája, agykamrai érfonatai és erei erős RALDH2 immuncitokémiai jelölődést mutattak. E RA termelő valamint RALDH3 enzimet expresszáló sejtek pontos azonosításán és karakterizálásán jelenleg is dolgozom. Az ependyma réteg sejtjei, valamint a hippocampusra ráfekvő agyhártya és az abból a SGZ területére futó erek a termelt RA diffúziója révén részt vehetnek az őssejtek fenntartásában és differenciáltatásában. Az agyhártya fontos immunvédekezési és gyulladáscsökkentő funkciót is ellát. Feltételezzük, hogy ezekben a folyamatokban a meningeális eredetű retinsavnak is szerepe van, melyet *in vivo* műtétilag mechanikai sértést illetve gyulladást okozó modellrendszeren kívánok vizsgálni.

Az *in vitro* univerzális és az *in vivo* lokalizált RA termelés ellentmondását okozhatja a szubsztrát (ROL) hozzáférhetőségben fennálló különbség. Ennek vizsgálatára asztroglia sejtek hosszú ideig fenntartott kultúráinak RA produkciós képességét vizsgáltam normál és A-vitamin mentesített környezetben. Az F9 retinsav-riporter sejt vonalon végzett mérések tanúsága szerint elmondható, hogy az asztroglia sejtek retinsav termelése az idő előrehaladtával fokozódik valamint jelentős retinoid-raktározó képességgel rendelkeznek.

Témavezető: Dr. Környei Zsuzsanna

---