

1. A kisagy születés utáni fejlődésének vizsgálata (a kisagykéreg egyes sejt típusainak peri-és posztnatális integrálódása a kialakuló citoarchitektonikus szerkezetbe).

Purkinje sejteken végzett vizsgálatok

Egerekben és kismacskákban tanulmányoztuk a Purkinje sejtek integrációját a ganglionáris rétegbe. Megállapítottuk, hogy ennek az egysejtes rétegnek a kialakulása egy viszonylag hosszabb ideig tartó folyamat. Korábbi ismereteink szerint a rágcsálókban (egér, patkány) a születéskor a Purkinje sejtek már a növekedő kisagy-lebenyekék bázisánál találhatóak több (3-4) sejt sorba rendeződve, és a kisagy-lebenyekék növekedésével párhuzamosan nagyjából a születés utáni héten egy-sejtes rétegbe rendeződnek (alignment). Ezzel szemben – különösen a későn fejlődő vermalis VI-VII-es (vizuomotor) lebenyekben - a ganglionáris rétegben a Purkinje sejtek számának a növekedése a második posztnatális héten is tart, és döntően ez a kisagykérgi terület felelős a teljes kisagykéreg Purkinje-sejtszám abszolút értékeiben mért növekedésért. Megállapítottuk, hogy nyolc nappal a születés után (P8) a teljes kisagykéregre számított Purkinje sejtszám $199,080 + 2,966$, ami a születés utáni második hét végére (P20) $222,000 + 2,979$ Purkinje sejt/cerebellum emelkedett. Lényegében ezzel a sejtszámmal megegyező értéket ($225,800 + 7,549$ Purkinje sejt/cerebellum) kaptunk fiatal felnőtt (mindkét nemű) egerek vizsgálata során. A teljes kisagykéregre vetítve ez 13,4%-os növekedésnek felel meg. Az a tény, hogy a vizuomotor vermis fejlődik a legkésőbb (egérben a születés után két hetet is meghaladóan), összefüggésben lehet ezen terület fokozottabb sérülékenységeivel. Ez a terület érintett különböző neurológiai kórképekben, mint pl. az autizmus, ahol a betegek 95%-ában ez a kérgi terület hypoplasiás, és kevesebb Purkinje sejtet tartalmaz, összehasonlítva más kisagykérgi területekkel, továbbá érintett kisagyi mutáns (*weaver*) egerekben, melyekben a vermalis VI és VII-es lebenyekben a Purkinje sejtek szelektív ectopiáját figyelték meg. (Vastagh et al., 2005a)

Vizsgáltuk a Purkinje sejtek számának születés utáni változását kismacskák cerebellumában is, és megállapítottuk, hogy az újszülött macskában kapott sejtszám ($1,097 \times 10^6$) néhány héten belül jelentősen megemelkedett ($1,805 \times 10^6$ a P42 illetve $1,895 \times 10^6$ a P72 időpontokban). A felnőtt macskák kisagykérgében átlagosan $1,429 \times 10^6$ Purkinje sejtet találtunk, ami az újszülött Purkinje sejtszámhoz viszonyítva mintegy 30 % növekedést jelent. Újszülött macskákban a Purkinje sejtek nem alkottak folyamatos monolayert, a ganglionáris rétegben jelentős „gap”-ek (Purkinje sejt hiányok) voltak megfigyelhetők, különösen a vermis

és a neocerebellum határán, a paravermalis kisagykérgi területen. Ezek a hiányok a születés utáni 3. héten eltűntek. Ugyanakkor a születés utáni hetekben differenciálatlan Purkinje sejtek (illetve azok kisebb-nagyobb csoportjai) voltak láthatók átmenetileg a kisagykéreg fehérállományában. A kismacskák kisagykéregben a születés után mért Purkinje sejtszám növekedés hátterében – legalábbis részben - a Purkinje sejtek integrációja állhat az említett „gap”-ekbe. Feltételezzük, hogy a felnőtt macskára jellemző Purkinje sejtszám kialakulásában programozott sejthalál (apoptosis) is szerepet játszik, ez magyarázhatja a P42/P72 korban mért, relatíve magasabb sejtszámhoz viszonyított csökkenést. (Vastagh et al., 2005b)

Lugaro sejteken végzett vizsgálatok

(b) Vizsgáltuk a kisagykéreg egyik eléggé „elhanyagolt” sejtípusának, a Lugaro sejteknek a születés utáni migrációját és a kialakuló citoarchitektonikus szerkezetbe történő integrációját a születés után kismacskákon, illetve fiatal felnőtt macskákon. Metabotrop glutamat receptor 1a (mGluR1a) valamint SMI 311 preembedding immunhisztokémiai módszerek segítségével vizsgáltuk a jellegzetes morfológiájú sejtek tér-és időbeli eloszlását. mGluR1a immunopozitív Lugaro sejtek – nem túl nagy számban - már az újszülött macskák kisagykérgében is detektálhatók voltak, elsősorban a fehérállományban valamint a fehérállomány és a belső szemcsesejt réteg határán. Számuk gyorsan növekedett (mintegy 6-7 szerezére) P15 napig, ezt követően fokozatosan csökkent (P135 napig). SMI 311 (egy nem-foszforilált neurofilament marker differenciálódó idegsejtekben) expresszióját Lugaro morfológiájú sejtekben a születés utáni második hét elejétől (P8) figyeltük meg (kisebb számban a fehérállományban, illetve a belső szemcsesejt rétegben). A második-harmadik héttől az infraganglionáris (a Pu sejtek szómája alatt elhelyezkedő) SMI 311 immunopozitív Lugaro sejtek száma fokozatosan emelkedett (mintegy 12-14 szerezére) egészen a macskák fiatal felnőtt koráig. Fenti kísérleti eredményeink alapján arra következtetünk, hogy: (i) a Lugaro sejtek csak a születés után és integrálódnak a kisagykérgi citoarchitektonikus szerkezetbe; (ii) ez a folyamat több hónapig tart; (iii) fiatal felnőtt macskák kisagykérgében 8000-10000 Lugaro sejt található; (iv) a rágcsáló fajokban leírtaktól eltérően, a Lugaro sejtek macskában nem mutatnak calretinin immunoreaktivitást. (Víg et al., 2003)

Unipoláris ecsetsejteken végzett vizsgálatok

Humán vermalis kisagykérgi mintákon tanulmányoztuk a kisgykéreg serkentő interneuronjainak, az unipoláris ecsetsejteknek (UBC) a tér-és időbeli megjelenését. Megállapítottuk, hogy humán foetusokban a 24. gesztációs héten calretinin immunoreaktív UBC-k még nincsenek jelen, ezek a sejtek csak a 28. héten jelennek meg. Születéskor elsősorban a vestibulo-cerebelláris területeken található, de relatíve kisebb számban. A születés után vizsgált időpontokban (3. 5. 8,5 és 11. hónapos korban) a csecsemők kisagykérgében az UBC-k száma fokozatosan emelkedik, követve a vermalis lebenyek rostro-caudalis fejlődését, illetve egy sajátos intralobularis eloszlást (a lebenyek mélyen indentált területein számuk korábban emelkedik és magasabb, mint ugyanazon lebenyekben a subpialis területeken). A belső szemcsesejt rétegen belül az UBC-k korábban jelennek meg a Purkinje sejtek alatt, és csak később figyelhetők meg a szemcsesejt réteg mélyebb (fehérállományhoz közelebb eső) területein. Jóllehet a vizsgált 11 hónapos korban az UBC-k eloszlása lényegében hasonló mint a vizsgált felnőtt kisagykéregben, számuk azonban kevesebb mint az eddig megvizsgált idősebb korú (60 év felett) kisagykérgi mintákban. Ez felveti a humán kisagykéreg citoarchitektonikus szerkezetének lassúbb, időben elnyújtottabb fejlődését illetve kialakulását, mely a jelenlegi, általánosan elfogadott ismereteink alapján nagyjából a születés után 1 évvel fejeződik be (amikorra a szemcsesejtek a külső szemcsesejt rétegből a belső szemcsesejt rétegbe vándorolnak). (Víg et. al., 2005)

A molekuláris réteg interneuronjainak vizsgálata

Korábbi elképzelés szerint a molekuláris réteg interneuronjait (csillag-és kosársejtek) a fejlődő kisagy másodlagos germinatív zónájából, azaz a külső szemcsesejt rétegből származtatták. Zhang és Goldman (1966) vizsgálatai azonban bebizonyították, hogy ezek a sejtek a IV. agykamra subventricularis zónájából származnak, progenitoraik illetve prekurzoraik a kisagykéreg fehérállományában osztódnak és vándorolnak a molekuláris rétegbe, ami rágcsálókban a posztnatális fejlődés során megy végbe. Ennek részletesebb, tér-időbeli alakulását vizsgáltuk doublecortin (DCX) és parvalbumin immuncitokémia alkalmazásával, fejlődő egerek kisagyában. A DCX egy mikrotubulushoz asszociált fehérje, ami a migráló és differenciálódó idegsejtekben expresszálódik, jelenlétét a kisagyban immuncitokémiai módszerekkel is kimutatták vándorló szemcsesejtekben és Purkinje sejtekben (Gleeson et al., 1999). Megállapítottuk, hogy DCX immunpozitív, bipoláris

(vándorló) sejtek már a születés utáni 5. napon (P5) is megfigyelhetők a kisagykéreg „mélyebb” területein, a kisagymagok körül, illetve a lebenyekék fehérállományában. Ezen sejtek száma jelentős mértékben növekedett a születés utáni második héten, és a P11-P12 napokon ideiglenes migrációs ösvényekbe rendeződve tűntek elő, főleg a lebenyekék tengelyében futó nagyobb erek szomszédságában. A bipoláris sejtek (gyakran 2-3 sejt egymás utáni sorba rendeződve) megfigyelhetők voltak a belső szemcsesejt rétegben, illetve a fejlődő molekuláris réteg területén is. A molekuláris rétegben nehezen voltak elkülöníthetők a még perzisztáló „lefelé” vándorló – és a DCX-et szintén expresszáló – szemcsesejt prekurzoroktól. A bipoláris, DCX pozitív sejtek száma a születés utáni 3. héten fokozatosan csökkent a fehérállományban, ugyanakkor a molekuláris rétegben lévő sejtek bipoláris morfológiája megváltozott, nyúlványaik remodellációjának kezdeti fázisa multipoláris jellegű sejtekké világosan megfigyelhető volt. Végül ezek a sejtek a születés utáni 3. hét végére eltűntek a kisagykéregből. Parvalbumin immuncitokémia alkalmazásával követtük a molekuláris réteg interneuronjainak integrálódását: néhány PA immunoreaktív sejt a P8. napon jelent meg a Purkinje sejtek szómája felett. P12. napra a fejlődő molekuláris réteg alsó egyharmadában, P 15. napra alsó kétharmadában voltak láthatók, fokozatosan „feltöltve” a molekuláris réteget a P18/P21 napra. Jóllehet a DCX és parvalbumin koegzisztenciáját nem sikerült kimutatnunk (negatív kettős festés), a molekuláris rétegbe bevándorló, majd remodellálódó sejtek többsége nagy valószínűséggel a molekuláris réteg interneuronjainak felel meg. Vizsgálataink alapján a szemcsesejt „lefelé” vándorlása a másodlagos germinatív zónából a belső szemcsesejt rétegbe döntően a születést követő P4-P10 időintervallumban történik meg, a molekuláris réteg interneuronjainak „felé” irányuló migrációja néhány napos eltéréssel mutat maximumot, és döntően a 2.-3. posztnatális héten megy végbe. (Természetesen van átfedés a két folyamat között.). A fejlődő kisagykéreg fehérállományában átmenetileg megjelenő, migrációs kötegekbe rendeződő bipoláris sejtek mindig a szagittális síkokba orientáltak. Az a tény, hogy ezek a migrációs kötegek a kisagylebenyekék tengelyében futó erek közvetlen szomszédságában vannak arra utal, hogy a vascularis mikrokörnyezet (az endothel sejtek és környező asztroglia sejtek által termelt „faktorok”) kedvező a sejt migrációhoz. Eddigi vizsgálataink szerint a „felé” migráló sejtek döntően egymást, és/vagy a fehérállományban futó axonokat használják mozgásuk közben, és glia elemek (radier vagy Bergmann glia) ezen sejtek migrációjához nem szükségesek (ellentétben a kisagykéreg többi sejtalkotójának migrációjával). Természetesen, a molekuláris réteg interneuronjainak részletesebb mozgáselemzése további vizsgálatokat igényel. (Takács et al., 2007a,b, submitted for publication)

2. A kisagy születés utáni fejlődésének kísérletes károsítása

A kisagy posztnatális fejlődési plaszticitásának tanulmányozásához kidolgoztunk egy olyan modellt, melynek segítségével különböző mértékű, illetve különböző kisagyterületeket eltérő mértékben érintő károsodást lehetett előidézni. A születést követő 3'-5'-brómdeoxi uridin (BrdU) kezelés hatására a kísérleti állatok (elsősorban egerek, kisebb számban kismacskák illetve patkányok valamint csirkék) szomatikus és idegrendszeri fejlődésének jelentős retardációja, illetve részleges károsodása alakul ki. A dózis-függést részletesen nem vizsgáltuk, de az alkalmazott dózis más irodalmi adatokkal összehasonlítva kifejezetten alacsony, 50 ug/g/nap volt, (ami a kezeléseket 6 illetve 12 napig folytatva 300 illetve 600 ug/g kumulatív dózissal felelt meg). Az 50 ug/g/nap dózissal a 2-3-szorosa súlyos máj-elváltozásokat (zsírmáj), valamint vese-és bélelváltozásokhoz társuló táplálkozási (felszívódási) zavarokat okozott, továbbá a retinát is súlyosan károsította (egyik, vagy mindkét szemükre vakok voltak a kísérleti állatok), különösen a fiatal patkányok BrdU kezelését követően. Ezért vizsgálataink során csak az 50 ug/g/nap BrdU dózist alkalmaztuk.

BrdU kezelés hatása a szomatikus fejlődésre

Vizsgálataink szerint a BrdU kezelés hatékonysága két tényezőtől függött: a kezelés megkezdésének idejétől, illetve a kezelés időtartamától. A kezelés hatékonysága a kezelt egerek testsúlyának mérésével jól követhető volt. A születés napján kezdett BrdU bevitel volt a leghatásosabb, a P1 napon szintén hatásos, a P3 napon kezdett kezelés mérsékelten, míg a P7 nap után történő kezelések lényegében hatástalannak bizonyultak. A korai (P0-P3) napokon kezdett kezelések hatékonysága függött a kezelés időtartamától: a rövidebb ideig (3-4 nap) tartóak kevésbé, a hosszabb időtartamú kezelések (5-12 nap) hatásosabbak voltak. A korai posztnatális napokon kezdett kezelések hatására az állatok testsúlya szignifikánsan kisebb maradt, és jobbra 1-2 hetes „késéssel” követte a kontroll egerek testsúlygyarapodását. A „súlyos károsodás” modellben 120 napos túlélés után a kezelt és kontroll csoportok között szignifikáns (mintegy 20%-os) testsúlykülönbség – mindkét nemű egerek esetében - megfigyelhető volt. (Takács et al., 2003a)

BrdU kezelés hatása a kisagykéreg szemcsesejtjeire és a Purkinje sejtekre

A BrdU kezelés során a bázisanalóg beépül az S fázisban lévő sejtek DNS láncába, ahol a nagyméretű Br atom zavart okoz, ami végső soron az érintett sejtek pusztulását okozhatja. Rágcsálókban a perinatális/posztnatális fejlődési periódusban a kisagy legintenzívebben proliferáló sejtjei a szemcsesejtek, melyek a rombikus ajkak területéről nagyjából a születés idejére már a kisagyi primordium (leendő kisagykéreg) tetejére vándoroltak, és egy igen intenzív proliferációs szakaszon mennek át a születés utáni néhány nap során, jelentősen felszaporítva a szemcsesejt prekursorok számát a külső szemcsesejt rétegben (jelentősebb mértékű levándorlásuk a belső szemcsesejt rétegbe csak a P3 napon kezdődik egérben). A születés után alkalmazott BrdU bevitel tehát a szemcsesejteket érinti elsődlegesen, és számos szemcsesejt elpusztul (az osztódó alakok mellett apoptotikus alakok jól megfigyelhetők a külső szemcsesejt rétegben). A szemcsesejt-vesztés mértékét mediansagittális metszeteken a szemcsesejt réteg planimetrálásával jellemeztük fiatal felnőtt állatokon: a terület-csökkenés P0-P5 napokon végzett BrdU kezelést követően mintegy 25%-os, P0-P11 intervallumban végzett BrdU kezelés után 50%-ot meghaladó mértékű volt. A különböző idő-ablakokban végzett BrdU kezelés is eltérő mértékben befolyásolta a szemcsesejt vesztést: a belső szemcsesejt réteg terület-csökkenése P0-P11 kezelési intervallumban 56%, P3-P14 intervallumban 44%, P5-P17 intervallumban 27%, végül P9-P20 intervallumban 10% volt. A BrdU kezelés szemcsesejt-károsító hatásának igen kifejezett idő-függése azzal magyarázható, hogy a születés napján, vagy a korai időpontokban (P1-P4) elpusztuló szemcsesejt progenitorok, mivel nagy valószínűséggel több sejtosztódáson mennének keresztül, hatványozottan több szemcsesejt prekursor „kiesését” eredményezik.

A fejlődő kisagykéregben a BrdU kezelés látványosan érinti a Purkinje sejtek egy szubpopulációját (nagyjából a sejtek egyharmadát), amelyek korábbi vizsgálataink szerint csak a születés után, egy elnyújtott fejlődési periódus során vándorolnak a helyükre és integrálódnak a ganglionáris rétegbe, továbbá megakadályozza a Purkinje sejtek monolayer-be rendeződését is. Ectopikus Pu sejtek legnagyobb számban a későn fejlődő rostralis – neocerebellaris - kisagyi területeken (lobulus simplex, lobulus anterior) a flocculus/paraflocculus lebenyekében, valamint a szintén későn fejlődő vizuomotor vermisben (declive, tuber) voltak láthatók, továbbá a mesencephalon/metencephalon határán a IV. agykamra subventricularis zónájában és kisebb számban a colliculus inferior területén.

Az ectopikus pozícióban megrekedt sejtek egy része elhal (a Purkinje sejtek degradációjának morfológiai jelei elsősorban a „túldifferenciálódott” sejteken voltak jól láthatók). A „súlyos károsodás” modellben tehát kifejezetten érintett a kisagykéreg citoarchitectonikus szerkezete is, a szemcsesejtek száma nagyjából a felére, a Purkinje sejtek száma (elsősorban a később fejlődő lebenyekben) 15-30%-kal csökken. Az „enyhe károsodás” modellre a kisagykéreg posztnatális fejlődésének a retardációja, (a külső szemcsesejt réteg hosszabb jelenléte), a szemcsesejtek nagyjából egynegyedének elvesztése, a Purkinje sejtek egysejtes rétegbe rendeződésének zavara, valamint utóbbiak számának mintegy 10%-os csökkenése volt jellemző. (Takács et al., 2003b)

A fejlődő kisagykéreg szerkezetében a BrdU kezeléseket követő citoarchitectonikus anomáliák (elsősorban a Purkinje sejtek migrációs és rétegbe rendeződésének zavarai) háttérben feltevésünk szerint az állhat, hogy a szemcsesejtek számának csökkenésével kevesebb a reelin, amit a posztnatális periódus során a szemcsesejtek termelnek, és fontos szignalizációs molekula a kisagyfejlődésben. (A kérdés részletesebb elemzése további vizsgálatokat igényel.)

A mozgáskoordináció zavarai BrdU kezelést követően

A fentiekben említett „súlyos károsítás” és „enyhe károsítás” protokollok szerint végzett BrdU kezelést követően vizsgáltuk az egerek mozgását egy-és három hónapos kor között, kéthetes időintervallumokban (öt alkalommal). Ebben az asztal felett kb. 70 cm magasan rögzített, 1 m hosszúságú és 0,7-0,8 mm átmérőjű durva felületű fapálca (un. beam-walking) volt segítségünkre. Mértük az út megtételéhez szükséges, illetve a pálcán eltöltött időt, és számoltuk a lépés-tévesztések (illetve a korai időpontokban a leesések) számát. A kísérleti állatok „teljesítménye” mindegyik kísérleti csoportban (beleértve a kontrollokat is) javult a gyakorlások számának növekedésével, de a különbség a kezelt és a kontroll csoportok között mindvégig megmaradt. A pálcáról csak a „súlyos károsodás” modell szerint kezelt állatok estek le, főképp az első és második teszt során. A mozgáskoordináció zavarának, a zavar mértékének megítélésére legalkalmasabbnak a lépéstévesztések száma bizonyult, ami igen jól korrelált az előzőekben ismertetett morfológiai elváltozások súlyosságával. (Az enyhébb fokú morfológiai eltéréseket felnőtt egyedekben kisebb mértékű mozgáskoordinációs zavarok kísérték.) A mozgáskoordináció vizsgálata céljából méréseket végeztünk az un. rotarod módszerrel is, a nagyobb szórás miatt azonban ezekhez a mérésekhez nagyobb

állatszám szükséges. Ezen mérések során egy kísérleti csoportot mindig egy-egy alom jelentett, és átlagosan csak mintegy 4-6 állat alkotta az alomokat (az esetenként előforduló elhullások miatt).

Ezeket a vizsgálatokat kiegészítettük olyan kísérletekkel, melyekben a BrdU-val kezelt egereket mozgás-inger gazdag (mókuserék, mászórudak, ferde rácsok) környezetben, illetve teljesen sima aljzatú és falú ketrecben neveltük, ahol csak az aljzaton tudtak mozogni. Vizsgáltuk ezen csoportok mozgáskoordinációjának alakulását is, és minden teszt során azt tapasztaltuk, hogy szignifikánsan jobban mozogtak az inger-gazdag környezetben tartott állatok. A vermis planimetrálásával kapott eredmények – jóllehet nem érték el a szignifikancia szokásos határát – de tendenciájukban minden esetben a kisagykéreg vermális területének a növekedését mutatták. A szemcsesejt réteg területének mérsékelt növekedéséhez hozzájárulhattak azok a sejtek is, melyeket relatíve kis számban, de minden esetben meg tudunk figyelni a kezelt csoportokban: a molekuláris rétegben bipoláris, a piára merőleges orientációjú, és a perinatális korban igen nagy számban migráló sejtekhez nagyon hasonló sejteket. Ezek a sejtek – hónapokkal a születés után – származhatnak a pia alatt megrekedt, ektopikus sejtek csoportjaiból, melyek egy része valószínűleg megőrzi osztódó- és migrációs képességét. Természetesen ezen sejtek kis száma nem alkalmas a károsított kisagykérgi citoarchitektonikus szerkezet jelentősebb helyreállításához, de mint lehetőség – különösen azon repair-mechanizmusok megismerését követően, melyek megléte a gerincesek központi idegrendszerének több területén is bizonyított - a kisagykéreg esetében is figyelmet érdemelnek.

Szokatlan morfológiájú Purkinje sejtek megjelenése BrdU kezelést követően

A BrdU-val kezelt, mindkét nemű C57Bl6 egerek kisagykérgében a Purkinje sejtek szokatlan morfológiájú alakjait figyeltük meg. Ezen sejtek citoplazmája hatalmas „üregeket” tartalmazott, ugyanakkor súlyosabb degradációra utaló morfológiai jelek nem, vagy csak ritkán voltak megfigyelhetők. Ezek a sejtek kifejezetten expresszálták a metabotróp glutamát receptor 1a-t, továbbá a Purkinjes sejtek egyik markerének tekintett calbindin DK28 kalciumköti fehérjét is. A sejtek szomatikus és dendritikus tüskéi kialakultak, és morfológiai megjelenésüket tekintve típusos szinapszisokat képeztek parallel- illetve kúszó rostokhoz hasonló morfológiájú axonterminálisokkal. Az atipusos morfológiájú Purkinje sejtek jellemzően a vermis I., VIII., IX. és X. lebenyében voltak megfigyelhetők, elsősorban a

születés utáni P5-P8. napokon, később számuk csökkent, illetve eltűntek a kisagykéregből. Elvégeztük ezen sejtek – és a környező kisagykérgi struktúrák – 3D-s rekonstrukcióját, Epoxi gyantába ágyazott mintákból készített 0,75 µm-es sorozatmetszetek segítségével. A szokatlan morfológiájú Pu sejtek majdnem kizárólagosan kapillárisok szoros közelségében fordultak elő. A kapillárisok (elsősorban az endothel sejtek) károsodása 2-3 nappal mindig megelőzte a szokatlan morfológiájú Purkinje sejtek megjelenését. A károsodott kapillárisok körül apróbb vércékek is kialakultak. A születés után alkalmazott BrdU nagy valószínűséggel károsítja a kisagyi vaszkulogenezis-t is, hasonló mechanizmus révén, mint az intenzíven proliferáló szemcsesejteket (az S fázisban lévő endothel sejtekbe szintén beépül a timidin-analóg). A kapillárisok szomszédságában relatíve gyakran figyeltünk meg kétmagvú Purkinje sejteket is. Kétmagvú Purkinje sejteket megfigyeltek normál kisagykéregben is, és mint a kisagykérgi Purkinje-sejt pótlás sejt-fúzióval történő lehetőségét írták le (Alvarez-Dolado et al., 2003), a csontvelősejtek Purkinje sejtekké történő transzdzifferenciálódásának (Priller et al., 2001) lehetősége mellett. Ezen körülmények, valamint a szokatlan morfológiájú Purkinje sejtek kialakulásának „dinamikája”, elsősorban az átmeneti formák jelenléte felvetik egy a megszokottól eltérő fejlődési alternatíva (fúzió, illetve pluripotens őssejtekből vagy transzdzifferenciálódás útján a perivaszkuláris sejtekből) lehetőségét a BrdU-s kisagykárosítás modellben is, ami BrdU kezelés okozta fejlődésbeli retardáció, károsodás és citoarchitectonikus anomáliák kompenzálására, „kijavítására” irányulhat. Ennek a hipotézisnek az igazolása természetesen még várat magára, a fentebb vázolt jelenség azonban megerősíti a kisagyi Purkinje sejtek meghökkentő mértékű morfológiai plaszticitását. (Takács et al., 2006a,b)

A molekuláris réteg interneuronjainak deficitje BrdU kezelést követően

A születés után P0-P5 időintervallumban végzett szisztémás BrdU kezelést követően P30-P35 napos, kezelt és kontroll egerek kisagykérgében parvalbumin immunfestéssel megfestettük a kisagykéreg molekuláris rétegének interneuronjait, a csillag-és kosársejteket. A vermalis V. lebeny egyenes szakaszán mérve meghatároztuk az egységnyi (1 mm²) molekuláris réteg területre eső interneuronok számát, amiben BrdU kezelt egerek kisagyában a kontrollhoz viszonyítva 25-30%-os csökkenést figyeltünk meg. Az interneuronok számának csökkenése több okra is visszavezethető: (i) A BrdU kezelés károsítja, illetve részlegesen eliminálja a korai posztnatális fejlődési periódusban osztódó molekuláris réteg interneuron prekursorokat; (ii) zavart szenved ezen prekursorok vándorlása a kisagy fehérállományából a molekuláris

rétegbe; (iii) a sejtek DNS-ének, illetve a transzkripció mechanizmusok károsodása következtében csökken ezen idegsejtekben a kalcium-kötő fehérje expressziója.

A felvetett lehetőségek részletesebb tanulmányozása további vizsgálatok tárgyát képezheti.

3. A kutatási témához kapcsolódó további vizsgálatok

A secretin eloszlásának vizsgálata az idegrendszerben

Részt vettünk a secretin idegrendszeri eloszlásának vizsgálatát (patkányban, macskában illetve postmortem humán mintákban) célul tűző munkákban, mely során megállapítást nyert, hogy ez a peptid nagy mennyiségben detektálható néhány kérgi terület (piramis sejtek a motoros kéregben), a hallórendszer primer szenzoros neuronjai illetve spinalis ganglionsejtek mellett a kisagykérgi Purkinje sejtekben és a kisagymagokban. Ez felveti a secretin jól ismert gastrointestinalis szerepén túlmenően idegrendszeri (neuropeptid) szerepének lehetőségét, továbbá ezen peptid kapcsolatát az autizmussal. (Köves et al., 2004)

A posztnatalis BrdU kezelés okozta idegrendszeri változások vizsgálata az agykéregben

Jelen pályázat keretében célul tűztük, hogy az autista betegek kisagyának vizuomotoros vermalis területein igen nagy gyakorisággal megfigyelt hypoplaziát, illetve a kapcsolódó központi idegrendszeri anomáliákat is vizsgáljuk. Nyilvánvaló, hogy az autizmus nem elsősorban a kisagy „betegsége”, de feltehetően egy olyan fejlődési rendellenesség húzódhat meg a háttérben, ami az egyedfejlődés egy specifikus szakaszában károsítja az idegrendszert. Mint azt a korábbiakban részletesen leírtuk, a születés után alkalmazott krónikus BrdU kezelés határozottan károsította fejlődő egerek kisagyának vizuomotor vermalis területeit, ezért ezeken az egereken kezdtük meg a nagyagykéreg esetleges károsodásainak vizsgálatát (először a szomatoszenzoros kéreg területén, mivel ezen kéregterület egyes elektrofiziológiai jellemzőit már korábbi kollaboráció keretében vizsgáltuk). A vizsgálatokat kiegészítettük morfológiai valamint viselkedési (open field) vizsgálatokkal is. Megállapítottuk, hogy a posztnatalis BrdU kezelés retardálta a szomatoszenzoros kéreg fejlődését is, ami elsősorban a perinatalis-posztnatalis korban még a kéregbe vándorló/integrálódó GABAerg interneuronok számának mérsékelte, de szignifikáns csökkenésében, valamint a GFAP-t expresszáló asztrogliák számának (vagy up-regulációjának) kifejezett emelkedésében nyilvánult meg. A

kísérleti állatok agyából származó szövetszeleteken végzett elektrofiziológiai mérések a kontrollhoz viszonyított fokozott excitabilitást, megnövekedett facilitációt, továbbá megemelkedett „seizure” érzékenységet igazoltunk. Az open field viselkedési tesztek az egerek mérsékelt hiperaktivitását mutatták, de „ügyetlenebbek” voltak (a kisagykárosodás illetve mozgáskoordináció romlása miatt). (Béldi et al., 2006, Béldi et al., 2007, submitted for publication, J Neuroscience Research).

A zárójelentés részét képező „Közlemény adatbázis”-ban nem szereplő saját hivatkozások

Béldi M, Takács J, Bárdos Gy, Világi I. (2007) Postnatal BrdU treatment cause retardation in the somatosensory cortex in mice (Submitted for publication, J Neurosci Res.)

Takacs J, Zaninetti, R., Víg, J, Vastagh Cs, Hámori J. (2007) Postnatal expression pattern of doublecortin (DCX) in some areas of the developing brain of mouse. MITT XI. Konferenciája, Szeged 2007. január 24-27.

Takacs J, Zaninetti R, Víg J, Vastagh Cs, Hamori J.(2007) Postnatal spatial and temporal expression pattern of Doublecortin (Dcx) in the developing cerebellar cortex of mouse. (Submitted for Publication; Int. J. Dev. Neuroscience)