

Mezey Szilvia

**A postnatalis neurogenesis során képződő neuronok vizsgálata fiatal házi csirkék
(Gallus domesticus) előagyában**

Szakmai zárójelentés a D 048625 számú posztdoktori OTKA kutatási pályázatról

Budapest, 2010. augusztus 23.

A jelen kutatási pályázat keretében folytatott vizsgálatok révén feltártam, hogy naposcsibék középagyi dopaminerg magcsoportjaiban milyen kvantitatív változások történnek passzív ízelkerüléssel tanulás követően 24 órával az újonnan képződött sejtek mennyiségében. Továbbá, csirkeagyban először írom le a doublecortin (DCX) és neuronal nuclei (NeuN) immunpozitív idegelemek eloszlásának és sűrűségének időbeli változásait fiatal házi csirkék agyában. Valamint hozzájárultam a madár *nu. accumbens* lokalizációjának pontosításához.

1. A passzív elhárításos tanulás hatása a postnatalis sejtosztódás során képződő agysejtek sűrűségére naposcsibék középagyában

1.1 A téma rövid ismertetése

A csirkék passzív ízelkerüléssel tanulásában (PÍT) fontos szerepet játszanak a középagyi dopaminerg magok, a substantia nigra (SN) és az area ventralis tegmentalis (AVT). A SN motoros területei a tanulással kapcsolatos mozgáskoordinációban, míg limbikus területei és az AVT a PÍT-tel kapcsolatos érzelmi reakciók kialakításában játszik szerepet. Habár sokkal kisebb számban, de a születés után is képződnek új idegsejtek az agy egyéb területein, így a SN-ban és az AVT-ben is (Lie és mtsai, 2002; Zhao és mtsai, 2003; Kampen és Robertson, 2005; Yoshimi és mtsai, 2005). Ezen új sejtek neuronális természete azonban még vitatott (Frielingsdorf és mtsai, 2004). Az újonnan képződött sejtek kimutathatók a DNS-be a timidin helyére beépülő bromodeoxi-uridinnal (BrdU).

1.2 Anyagok és módszerek

1.2.1 Passzív elhárításos tanítás

Az első kísérletsorozatban (I.) 18, a másodikban (II.) 20 egy napos csirkének bromodeoxi-uridint adtunk i.p. (0.2 mg/ttg), majd az állatokat 30 perc múlva 3 csoportra osztottuk: 6 (I.) ill. 5 (II.) db naiv kontroll = PAL0; 6 (I.) ill. 8 (II.) db „vizes” kontroll = PALW; 6 (I.) ill. 7 (II.) db tanított állat = MeA. Elvégeztük a passzív elhárításos tanítást, melynek során a madaraknak egy fémpálcára erősített fémgömböt nyújtottunk be, amire szívesen rácsíptek (táplálékkereső viselkedés). A PAL0 csoport madarai semmilyen tréninget nem kaptak, míg a PALW csoport madarainak a gömböt vízbe, a MeA csoport madarainak pedig a kellemetlen ízű metilantranilátba mártottuk be. A MeA csoport madarai a gömbre még 24 órával a tanítás után is emlékeztek és elkerülték azt.

1.2.2 Az agyak feldolgozása

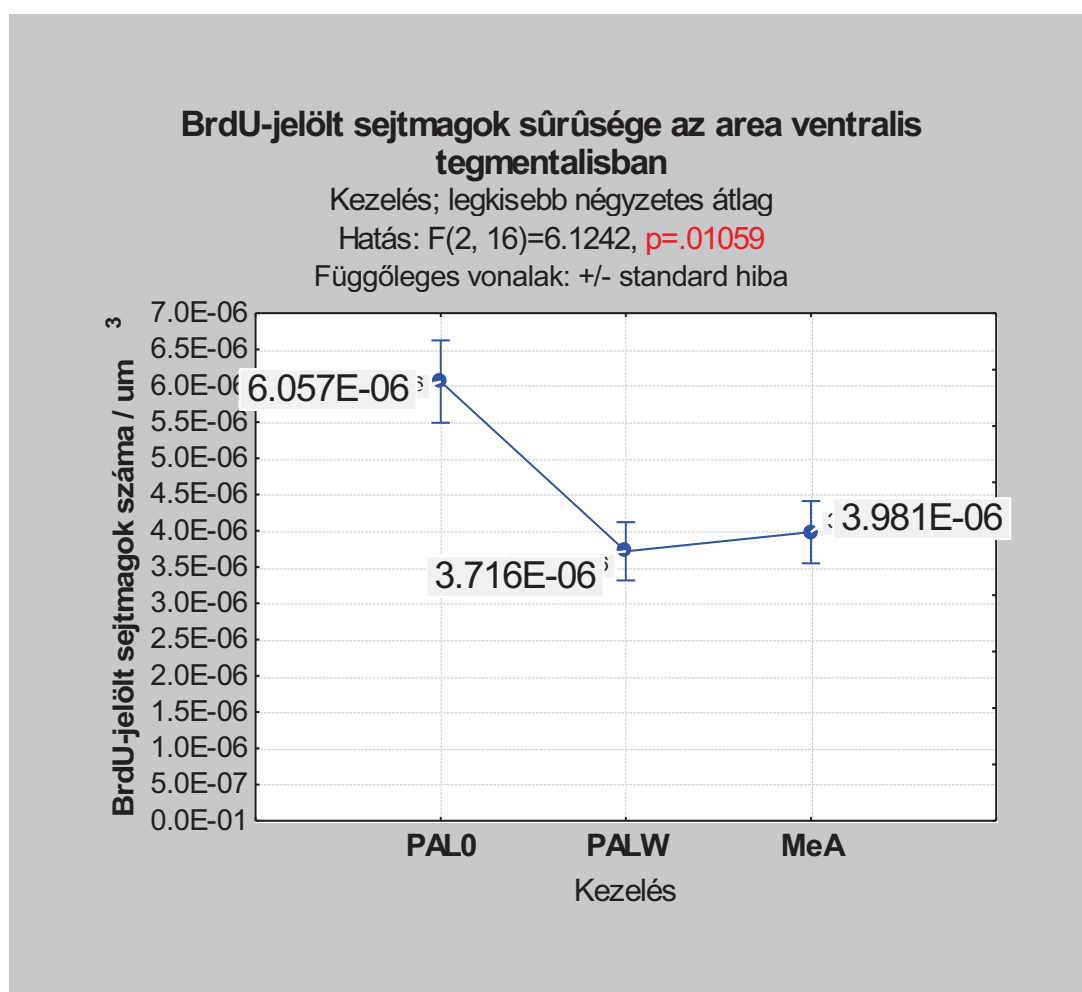
Az állatokat a tanítás után 24 órával, a tanulás tesztjét követően perfúziósan fixáltuk (4% paraformaldehid és 0.1 M foszfátpuffer keverékével), majd az agykból immerziós utófixálást (4% paraformaldehid és 0.1 M foszfátpuffer keveréke) és 20%-os cukoroldattal (0.1 M foszfátpufferben) való átitatást követően a középagyat kivágtam és fagyasztó mikrotómon 50 µm vékony szeletekre metszettem.

A DNS-be beépült BrdU-t és a dopaminerg magok pontos helyzetének meghatározásához használt tirozin-hidroxilázt (TH) immunhisztokémiával mutattam ki az agyseletekben. A metszeteket foszfátpufferes öblítés után 3N-es sósavban áztattam 20 percig, majd újabb foszfátpufferes mosást követően 1%-os marha szérumban áztattam 30 percig. Ezután kerültek a metszetekre a primer

antitestek (egér monoklonális anti-BrdU, Millipore, 1:300; nyúl poliklonális anti-TH, 1:1500) 2 éjszakán át 4°C-on tartva. Ezt követően a metszetekre újabb foszfátpufferes mosás után fluoreszcens festékekkel konjugált szekunder antitesteket tettem 90 percre (BrdU primer: Cy3-mal konjugált anti-egér IgG, Jackson Immuno Research, 1:250; TH primer: Alexa 488-cal konjugált anti-nyúl IgG, Invitrogen, 1:250). További foszfátpufferes öblítések után a metszeteket tárgylemezre húztam és foszfátpuffer és glicerin 1:1 arányú keverékével való nedvesítés után lefedtem.

A BrdU-jelölt (BrdU+) sejtmagokat és a TH-jelölt (TH+) sejttesteket fluoreszcens, ill. konfokális mikroszkóppal (Nikon-BioRad) vizsgáltam. A nem megfelelő perfúzióból adódóan gyenge minőségű BrdU immuncitokémia miatt mindhárom csoportból 1-1 állat kizárásra került.

1. ábra Az AVT-ben található BrdU+ sejtmagok átlagos sűrűségének megoszlása csoportonként a II. kísérletben (PAL0 = kontroll csop.; PALW = vizes kontroll csop.; MeA = tanított csop.).

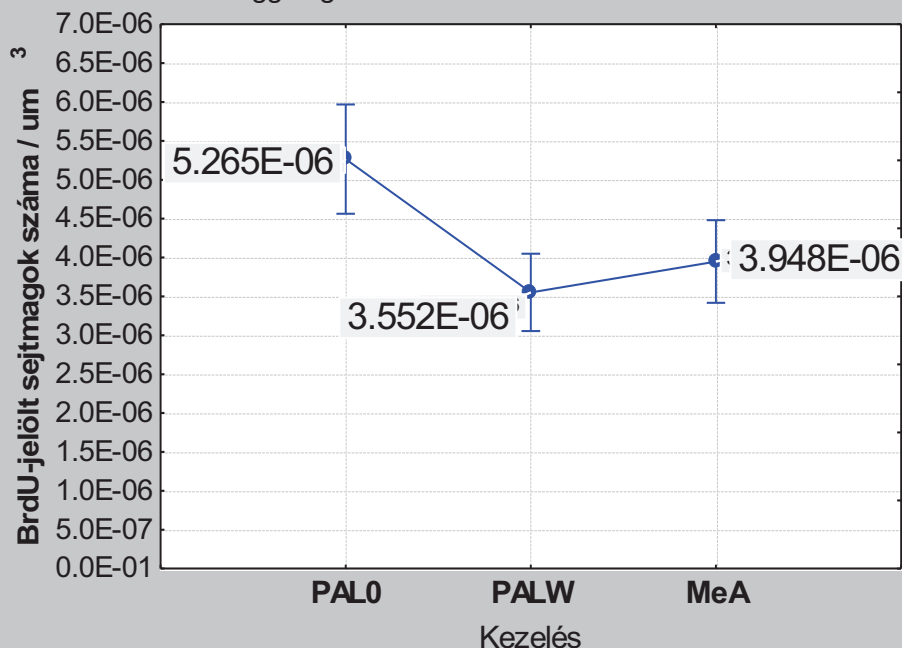


BrdU-jelölt sejtmagok sűrűsége a substantia nigrában

Kezelés; legkisebb négyzetes átlag

Hatás: $F(2, 16)=2.0145$, $p=.16584$

Függőleges vonalak: +/- standard hiba



2. ábra A SN-ban található BrdU+ sejtmagok átlagos sűrűségének megoszlása csoportonként a II. kísérletben (PAL0 = kontroll csop.; PALW = vizes kontroll csop.; MeA = tanított csop.).

1.2.3 Kvantitatív elemzés

A BrdU+ sejtmagok kvantitatív elemzését konfokális lézer scanning mikroszkóppal, az optikai frakcionátor modellt követve végeztem (Howard és Reed, 2005). Röviden, a SN ill. az AVT területéről véletlenszerűen kiválasztott régiókból a szövet teljes vastagságán átívelő optikai szeleteket scanneltem be. A z-sorozat szeleteiben megszámláltam az összes BrdU+ sejtmagot (software: Adobe Photoshop 5.0). Mivel a sejtmagok abszolút számánál informatívabb az adott térfogategységre eső sejtmagok száma, ezért a $\sigma = N / V$ egyenlet alapján kiszámoltam a sejtmagok sűrűségét. A mért területek nagyságát az ImageJ (1.4) software segítségével állapítottam meg.

1.2.4 Statisztika

A PAL0, PALW és MeA csoportok BrdU+ sejtmagjainak sűrűsége közötti különbségek statisztikai elemzését ismételt méréseket elemző ANOVA-val (a féltekék az egyes kezelési csoportokon belüli csoportokat képeztek) végeztem, majd az adatok post-hoc elemzéséhez Bonferroni tesztet használtam (Statistica 8).

1.3 Eredmények

A BrdU immuncitokémia alapján naposcsibék középagyában egyértelműen végbemegy posztnatalis sejtosztódás (feltehetően neurogenesis - 9, 16, 17), mivel a középagy valamennyi régiójában voltak BrdU+ sejtek.

A BrdU immunpozitív elemek sűrűsége hasonló volt a SN-ban és az AVT-ben. Az AVT-ben az újonnan keletkezett sejtek sűrűsége a kontroll csoporthoz viszonyítva szignifikánsan alacsonyabb volt a PALW csoportban ($p = 0.01$, 38.6%). A MeA csoportban is hasonló irányú (nem szignifikáns) változás történt (34.3%-os csökkenés). A SN-ban is hasonló trend mutatkozott, mert a BrdU+ sejtek sűrűsége ezen a területen is lecsökkent mind a PALW, mind a MeA csoportban a kontroll csoporthoz képest (32.5%-kal, ill. 25.0%-kal).

1.4 Megbeszélés

A PÍT-et követően megfigyelt változások a BrdU+ sejtmagok (posztnatalisan osztódó sejtek magjai) sűrűségében arra mutatnak, hogy PÍT hatására 24 órán belül mind a SN-ban, mind az AVT-ben csökken a sejtosztódás sebessége. Ez a korábbi, más agyterületeken végzett megfigyelésekkel ellentétes eredmény, mert azok szerint tanulás hatására több neuron képződik az emlős és madár hippocampusban (Dermon és mtsai, 2002; Patel és mtsai, 1997), valamint a madár asszociációs látóközpontban, medialis striatumban és tuberculum olfactoriumban (Dermon és mtsai, 2002).

Az adatok elemzése során megfigyelhető trendek statisztikai megerősítését gátolta, hogy mindkét kísérletnél az állatok között nagy individuális különbségek fordulnak elő a posztnatalis sejtosztódás aktivitásában. Az ebből adódó nagy variancia miatt az adott csoportméretek mellett a statisztikai tesztek csak egy esetben mutattak szignifikáns eltérést a csoportok között (II. kísérletnél a PALW csoportban szignifikánsan kevesebb BrdU+ sejt az AVT-ben).

A variancia csökkentésének elérésére nagyobb csoportméretek az adott technikai felszereltség mellett nem tudunk elérni, mivel a sejtosztódás napszaki változásokat is mutat és az adott technikai felszereltség mellett a jelen vizsgálatban foglalt 20 csirkénél többet ugyanazon a napon és egy napszakon belül nem tudunk perfundálni. Ezen probléma megoldására a már meglévő két külön kísérlet (I.-II.) eredményeit fogom egyesíteni.

1.5 Következtetések

A fenti vizsgálati megközelítést Dermon és mtsai. (2002) és Nikolakopoulou és mtsai. (2006) megfigyeléseire alapoztam. Szerettem volna kibővíteni a striatalis pályarendszerekben tanulás hatására történő sejtosztódásbeli változásokról szóló ismeretanyagot a subtelencephalicus régiókban bekövetkező eltérésekkel, mivel a tanulás hatására bekövetkező sejtosztódásbeli változásokat feltáró vizsgálatok emlősökben és madarakban is eddig szinte kivétel nélkül telencephalicus területekre koncentráltak.

Eredményeim értékelése során azonban feltűnt, hogy míg Dermon *et al.* (2002) és Nikolakopoulou és mtsai. (2006) 24 órával a BrdU injekció után már jelentős arányú (30-100%) érett (NeuN immunpozitív) neuront figyelt meg, addig a jelen vizsgálatban a dopaminerg sejtek lokalizációjához használt TH immunfestés egyetlen BrdU/TH kettősen immunfestett neuront sem mutatott ki, annak

ellenére, hogy mind a NeuN, mind a dopamin termelésre utaló TH az érett neuronokra jellemző és expresszációjuk a neuronban az érési folyamat során közel azonos időpontra tehető (Zhao és mtsai, 2003).

Mivel a neuronok érési üteme függ az állat fajtától és a vizsgált agyterülettől is, ezért a korábbi vizsgálatok és a fent leírt eredményeim közötti eltérések okainak tisztázására és a további kutatási irány megtervezéséhez szükségét láttam a fejlődő neuronokat jelölő doublecortin, valamint az érett idegsejtekre jellemző neuronal nuclei (NeuN) fehérje pontos lokalizációjának, valamint a kikelés utáni szakaszban mutatott eloszlásuk időbeli változásainak feltérképezését a csirkeagyban.

2. Doublecortin és NeuN pozitív idegelemek előfordulása és eloszlásuk időbeli változásai fiatal házicsirkék agyában.

2.1 A téma rövid ismertetése

Az agyban újonnan keletkezett sejtek esetében fontos megállapítani, hogy glia- vagy idegsejtek-e. Ennek egyik módszere a glia- ill. neuron specifikus markerek immunhisztokémiai kimutatása. Éretlen neuronok kimutatására használható a doublecortin (DCX), amely főként a vándorló neuronokban expresszált mikrotubulus-asszociált fehérje és az idegsejteknek az agykérgi rétegekbe való rendeződését irányítja (Brown és mtsai, 2003). Érett idegsejtek azonosítására a neuronal nuclei (NeuN) DNS-asszociált fehérje alkalmas (Mullen és mtsai, 1992), amelyet nemrég Kim és mtsai (2009) a Fox-3 transzkripció faktoraként azonosítottak. Emlősökben mindkét fehérjét széles körben használják idegsejtek jelölésére, madarakban azonban alapvető ismereteink hiányoznak eloszlásukról és expresszációjukról az agy fejlődése során történő változásairól. Kifejezetten érdekes a DCX eloszlása és annak változásai, mivel a madáragy nem rétegzett felépítésű, ezért a DCX funkciója részben eltérhet az emlősökben megfigyelttől.

2.2 Anyagok és módszerek

2.2.1 Western blot

A DCX és a NeuN egyértelmű jelenlétének, valamint az ellenanyagok specifikusságának megerősítésére Western blot kimutatást alkalmaztunk. Röviden, 2 ill. 8 napos fixálatlan csirkeagyakból kb. 0.05 g szövetmintát vettünk a ventriculus lateralis striatalis részen elhelyezkedő része mentén. A szövetmintákat 25 mM Tris (pH 8.0), 5% proteáz-inhibitor (Sigma), 1% nátrium dodekil szulfát (SDS), 0.6% nátrium deoxikolat, 0.1% MP40 (Sigma) és 0.75% nátrium-klorid keverékében lizáltuk szobahőn, majd 15.000 rpm-en, 4°C-on, 10 percig centrifugáltuk. A lizátumok fehérjekoncentrációját Lowry módszere alapján határoztuk meg. A fehérjék elválasztásánál minden fehérjéből 10 µg-ot futtattunk. A fehérjemintákat Tris (pH 8.9), akrilamidot (8 g/ml), 0.1% SDS-t, tetrametiléndiamint és 10% ammonium peroxodiszulfátot (Fluka) tartalmazó gélben futtattuk. Az elektroforézist követően a fehérjéket nitrocellulóz hártárra vittük át 20% metanol, 0.1 % SDS és tankpuffer keverékében konstans 400 mA-en (kb. 10V-on), 60 perc alatt. Blokkoláshoz 10%-os tejport használtunk TBS-ben (pH 7.2). A primer ellenanyagok egér monoklonális anti-NeuN (Millipore) 1:5000 és kecske poliklonális anti-DCX (Santa Cruz) 1:1000 voltak, melyekkel egy éjszakán át, +4°C-on inkubáltunk. A másodlagos ellenanyagokat 1:5000 hígításban használtuk (HRP-vel konjugált, kecskeellenes számár IgG (Jackson),

ill. peroxidázzal konjugált egérellenes ló IgG (Vector). Az antigéneket kemilumineszcens technikával azonosítottuk (Pierce Supersignal West Pico Chemiluminescent), hiperfilmen (Amersham).

2.2.2 Az agyak feldolgozása

Tizennyolc házi csirkének 0.2 mg/ttg BrdU-t adtunk be i.p., majd az állatokat 3 csoportra osztva, a BrdU injekció után eltérő időközökben (24 óra, 7 nap, 14 hét), azonos napszakban perfundáltuk (4% paraformaldehid és 0.1 M foszfátpuffer keverékével), majd az agyakat immerziós utófixálást (4% paraformaldehid és 0.1 M foszfátpuffer keverékével) és 20%-os cukoroldattal (0.1 M foszfátpufferben) való átítást követően fagyasztó mikrotómon 60 µm vékony szeletekre metszettem.

2.2.2.1 Immuncitokémia

A DCX és a NeuN térbeli eloszlása és annak időbeli változásai leírásához ABC-DAB reakciót, az újonnan keletkezett sejtek kvantitatív elemzéséhez pedig immunfluoreszcenciát alkalmaztam. A metszeteket foszfátpufferes öblítés után 3N-es sósavban áztattam 20 percig, majd újabb foszfátpufferes mosást követően 1%-os marha ill. szamár szérum albuminba tettem 30 percre. Ezután kerültek a metszetekre a primer antitestek (patkány monoklonális anti-BrdU (Abcam) 1:300; egér monoklonális anti-NeuN (Millipore) 1:10'000; kecske poliklonális anti-DCX (Santa Cruz) 1:100) 2 éjszakán át 4°C-on tartva. Ezt követően a metszetekre újabb foszfátpufferes mosás után fluorezcens festékekkel konjugált szekunder antitesteket tettem 90 percre 1:250 arányban (BrdU primerhez Alexa 594-gyel konjugált patkányellenes nyúl IgG (Invitrogen); NeuN primernél fluorezcens festéshez Alexa 488-cal konjugált egérellenes szamár IgG (Invitrogen), DAB reakcióhoz biotinilált egérellenes ló IgG (Vector); DCX primernél fluorezcens festéshez Cy5-tel konjugált kecskeellenes szamár IgG (Jackson), DAB reakcióhoz biotinilált kecskeellenes nyúl IgG (Vector)). Fluorezcens festéshez a három primer ill. szekunder ellenanyagot egyszerre, míg a diamino-benzidines előhíváshoz a DCX ill. a NeuN ellenanyagot, valamint a biotinilált szekunder ellenanyagokat egyenként alkalmaztam. Fluorezcens festésnél további foszfátpufferes öblítések után, míg DAB-os előhívásnál ABC-reakció alkalmazása és DAB-bal történő előhívás után a metszeteket tárgylemezre húztam és foszfátpuffer és glicerin 1:1 arányú keverékével való nedvesítés után lefedtem.

A BrdU-jelölt (BrdU+) sejtmagokat és a DCX-jelölt (DCX+) ill. NeuN-jelölt (NeuN+) sejteket konfokális mikroszkóppal (Nikon-BioRad) vizsgáltam.

2.2.3 DCX és NeuN pozitív idegelemek feltérképezése és az időbeli változások szemikvantitatív elemzése

A DAB-jelölt DCX- ill. NeuN-jelölt idegsejteket Olympus BX51-es mikroszkóppal vizualizáltuk, a metszeteket 4x-es nagyítással lefényképeztük, majd az immunjelölt elemek sűrűségét szemikvantitatívan agyatlasz ábrákra (Puelles és mtsai., 2007) vetítettük az ImageJ program segítségével (a lépések: 1. háttér levonása, 2. küszöbérték felvétele, 3. pixelméretre alapozott szűrés, 4. szürkeárnyalatos színskála alkalmazása). Az így kapott ábrákon a nagyobb DAB-intenzitású területek sötétebbek, míg a kevésbé jelölt területek a csökkenő jelölésintenzitással a szürke egyre világosabb árnyalatai, a nem jelölt területek pedig fehérek lettek.

2.2.4 Kvantitatív elemzés

A BrdU+ ill. NeuN+ sejtmagok és DCX+ citoplazmájú neuronok kvantitatív elemzését Nikon-BioRad konfokális lézer scanning mikroszkóppal, az optikai frakcionátor modellt követve végeztem (Howard and Reed, 2005). Az elemzéshez a BrdU injekciót követő 24 óra, ill. 7 nap múlva perfundált csoportból 2-2 csirke előagyának a ventriculus lateralis mentén lévő proliferatív területéről a szövet teljes vastagságán átívelő optikai szeleteket (z-sorozat) szkenneltem be mindkét féltekéből. A ventriculus lateralis mentén rostrocaudalis irányban 3 síkot vizsgáltam:

- rostralis sík: a ventriculus lateralis (VL) egyenesen húzódik a hyperpallium apicale (HA) és a medialis striatum (StM) között;
- intermediar sík: a VL medialis irányban kiöblösödik a mesopallium ventrale (MV) és a nidopallium intermedium (NI) síkjában;
- caudalis sík: a hyperpallium accessorium eltűnik a ventriculus lateralis dorsalis végétől, helyette ugyanitt a caudodorsolateralis pallium (CDL) jelenik meg).

Dorsoventralis irányban 5 szinten scanneltem a metszeteket: 1. HA (rostralis és centralis) / CDL (caudalis); 2. mesopallium dorsale (MD) / MV; 3. nidopallium intermedium pars centralis (NIC); 4. dorsomedial striatum (dStM); 5. ventromedialis striatum (vStM) (rostralis) / nucleus accumbens (Ac) (centralis) / nucleus striae terminalis lateralis (NSTL) (caudalis) (**4. ábra**). Az optikai frakcionátor modellt követve (Howard és Reed, 2005) egy teljes z-sorozat összes szeletében megszámláltam valamennyi BrdU / NeuN immunpozitív sejtmagot ill. a citoplazmában expresszálandó DCX esetében a BrdU-val ill. NeuN-nel jelölt sejtmagokkal való koexpressziót (Adobe Photoshop 5.0).

Mivel a sejtmagok abszolút számánál informatívabb az adott térfogategységre eső sejtmagok száma, ezért a $\sigma = N / V$ egyenlet alapján kiszámoltam a sejtmagok sűrűségét a ventriculus lateralis külső széléhez igazított 100x200 μm -es téglalap alakú területen, a metszet teljes vastagságán átívelő, összes optikai metszeten. A kettős jelölés bizonyításához az ImageJ 1.4 szoftver segítségével az optikai metszeteket tornyokba rendezve, ill. 3D-ban vizsgálva ellenőriztem, hogy a jelölt struktúrák teljes kiterjedésükben kolokalizáltak-e.

2.3 Eredmények

2.3.1 A DCX és a NeuN eloszlása és annak időbeli változásai csirkeagyban

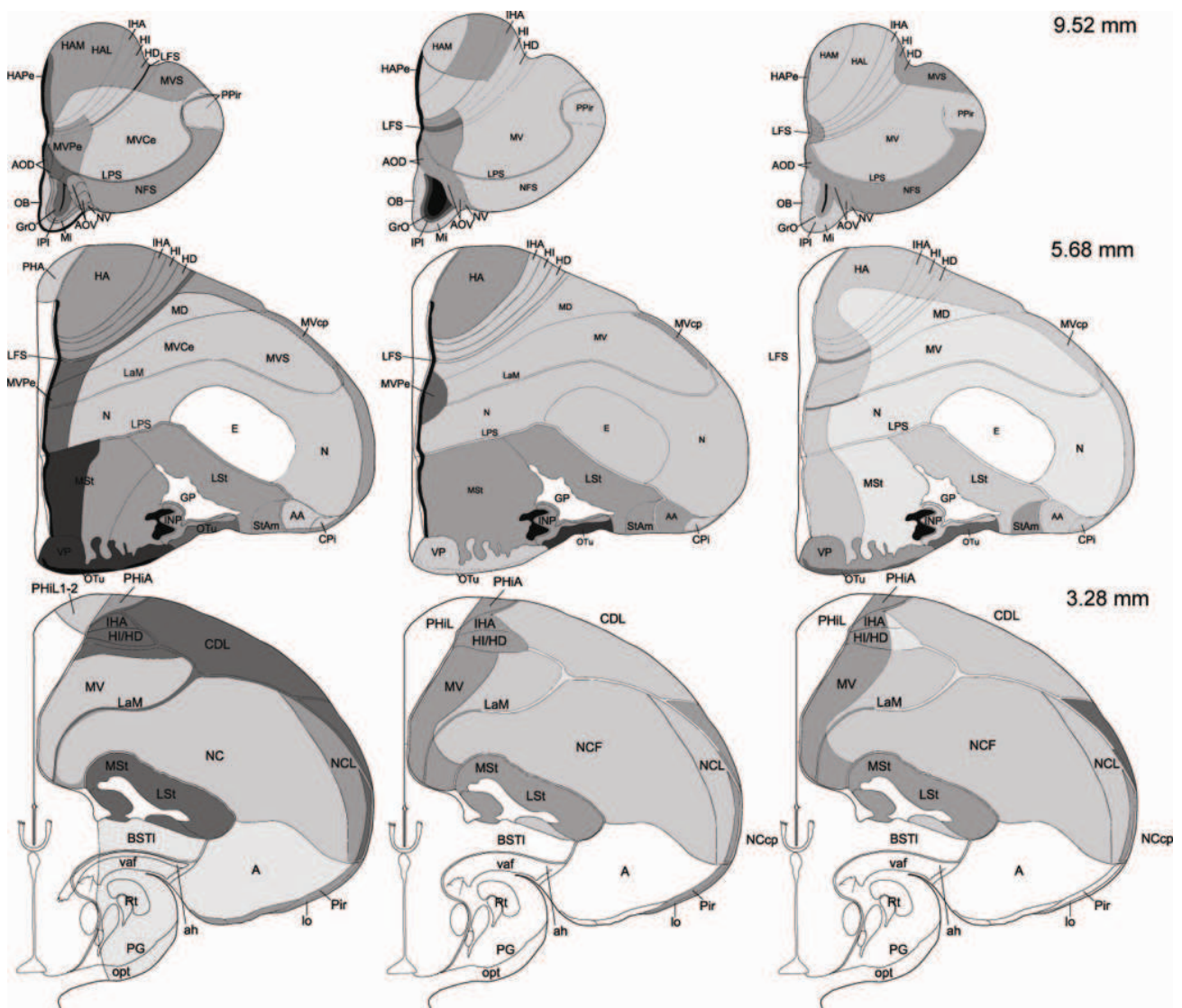
Mind a DCX, mind a NeuN ellenanyag specifikus festődést mutatott a csirkeagyban. A DCX a sejttestet és a nyúlványokat, míg a NeuN a sejtmagot és a sejttestet jelölte.

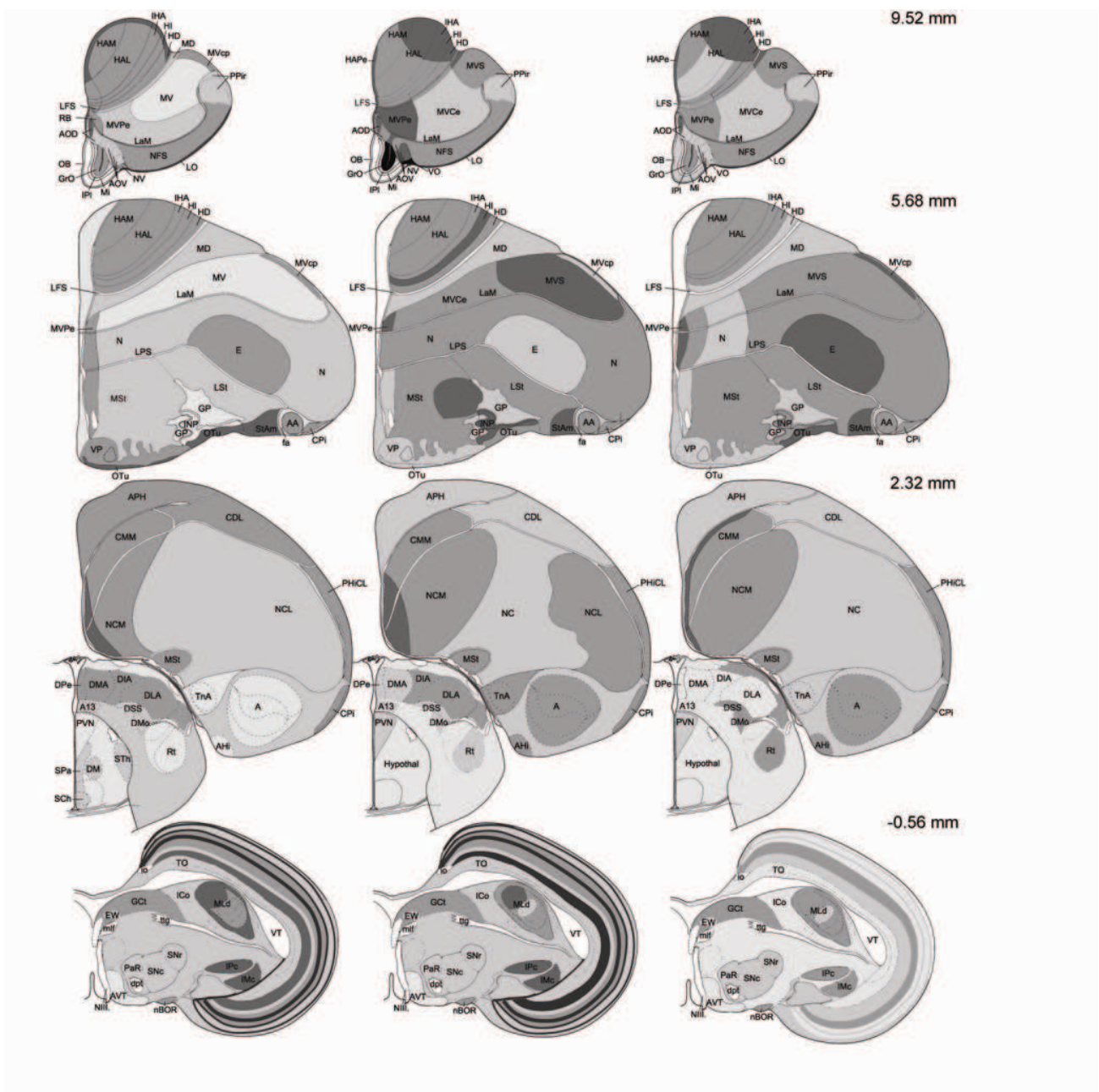
A kikelést követő időszakban a DCX-jelölés sűrűsége fokozatosan csökkent. A fiatal csirkék agyában történő aktív sejtvándorlásra utal, hogy DCX+ idegelemek az egész előagyban előfordultak, sűrűségük kiugróan magas volt a pialis és kamramenti területeken, az előagyi laminák mentén, valamint a kisagyi szemcsesejteken. A DCX jelölés mindhárom időpontban szinte teljesen hiányzott a diencephalicus és agytörzsi területeken, arra utalva, hogy ezekben a régiókban a kikelés után már nincs aktív sejtvándorlás. Eredményeink alapján caudalis síkokban a kikelés után az idegsejtek az előagyban a kamra mellett elhelyezkedő területekre vándorolnak be és épülnek be először, a magasabb rendű, prefrontalis kéreg ekvivalens területnek megfelelő caudodorsolateralis pallium a kikelés utáni időszakban csak később kolonizálódik. A lateralisabban fekvő területekre az új neuronok a nagyobb agyrégiókat elválasztó, sejtből ritkább lemezek, (a caudodorsolateralis pallium esetében a lamina

mesopallialis) mentén vándorolnak be. Míg a legtöbb előagyi régióban a kikelés után fokozatosan csökken az újonnan beépülő idegsejtek mennyisége, addig az emlős primer látókéregnek megfelelő entopalliumban a kikelés után 10 nappal, míg a ventralis palliumban a kikelés után 14 héttel egy-egy újabb kolonizációs hullám figyelhető meg (3. Ábra). Az ezekben a régiókban megjelenő vándorló neuronok feltehetően ott helyben telepednek le, ami az entopallium esetében követhető is, mivel a kikelés utáni 10. napon megemelkedett DCX+ jelöléssűrűséget követően a 14. héten az adott területen magasabb a NeuN+ sejtek száma is (4. Ábra).

A NeuN-jelölt idegsejtek Nissl-szerű eloszlást mutattak. Azonban csakúgy, mint emlősökben, néhány idegsejttípus a csirkében sem termel NeuN-t: ilyenek a kisagyi Purkinje-, csillag- és kosársejtek, valamint a szaglógumó mitralis sejtjei (Mullen és mtsai, 1992). A humán embriókban megfigyelttől eltérően azonban (Sarnat és mtsai, 1998), a csirke olivaris inferior magjainak neuronjai erős jelölődést mutattak. A SN, amely versenyegérformákban (Gerbillinae) teljesen NeuN immunnegatív (Kumar és

3. Ábra DCX-jelölt idegelemek eloszlása és sűrűségének változása 48 órával, 7 nappal, ill. 14 héttel a kikelés után.





4. Ábra NeuN-immunopozitív idegelemek eloszlása, annak sűrűsége és időbeli változásai a kikelés után.

Buckmaster, 2007), csirkékben a rostralis síkokban sem expresszál NeuN-t, míg a caudalis részben van NeuN jelölés. Az AVT azonban teljes rostrocaudalis kiterjedésében NeuN immunnegatív. A NeuN (Fox-3) expresszálásának adott idegsejtcsoportokban való hiánya további vizsgálatok tárgya lehet.

2.3.2 Az újonnan keletkezett idegsejtek kvantitatív elemzése a telencephalicus subventricularis zónában

Mind 3, ill. 10 nappal a kikelés után az összes BrdU+ sejt közül ~44% bizonyult idegsejtnak (DCX+ és/vagy NeuN+). A kikelés időpontjától távolodva a BrdU+ sejtek sűrűsége egyre csökkent, feltehetően

a BrdU-jelölés hígulásának (a leánysejtekben már csak a szülősejt DNS-ébe épült BrdU fele található meg), valamint a BrdU+ sejteknek a vizsgált területéről való elvándorlásának következményeképp. A kikelés után a DCX+ idegsejtek sűrűsége a rostralis területeken csökkent, míg az intermedier és caudalis szinteken emelkedett, ami arra utal, hogy a rostralis agyterületek növekedése (a beépülő neuronok által) hamarabb befejeződik, mint a caudalisabban fekvő régióké.

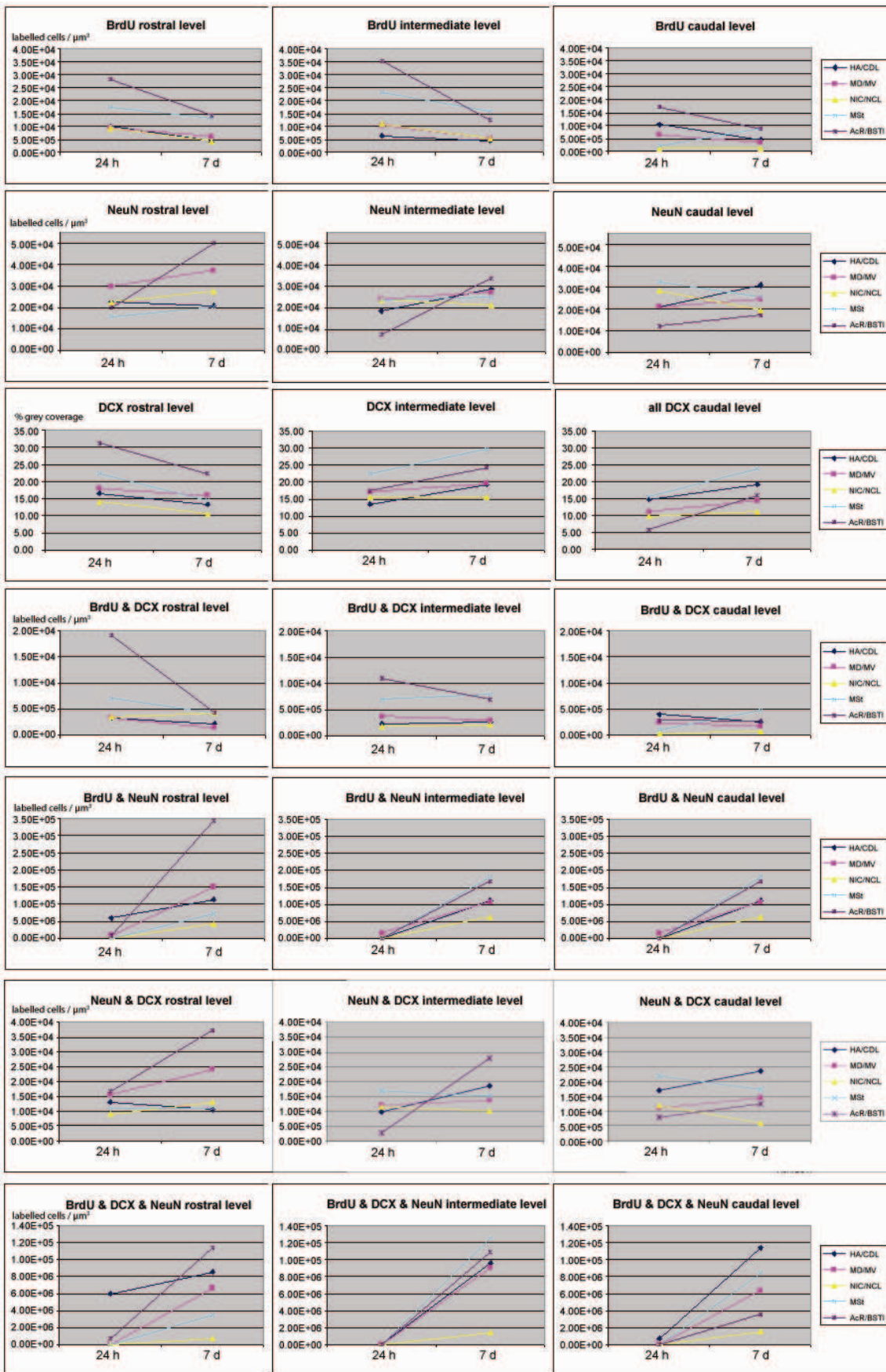
A NeuN+ idegsejtek sűrűségének változása nem volt egyirányú minden agyterületen (**5. Ábra**):

- Rostralis szinteken a neuronok sűrűsége kikelés után emelkedik a basalis ganglionok (medialis striatum, feltételezett nu. accumbens) medialis szélén, míg a dorsalisabban fekvő, magasabb rendű agyterületeknek (hyperpallium accessorium, mesopallium dorsale és ventrale, nidopallium) a ventricularis és subventricularis zónában fekvő sávjaiban az idegsejtek beépülése a kikelés után leáll, ami arra utal, hogy az ezeknek az agyterületeknek megfelelő zónákban keletkező idegsejtek laterálisabban fekvő régiókba vándorolnak.
- Intermedier szinten a NeuN+ sejtek sűrűsége enyhe emelkedést mutat a legtöbb agyterületen, bár ez a növekedés kevésbé jelentős, mint amit a DCX+ sejtek sűrűsége indokolna, arra utalva, hogy az itt keletkező neuronok laterális irányban kivándorolnak a kamra menti területekről.
- Caudalis területeken a NeuN+ neuronok sűrűsége a centralis régiókban (medialis striatum, feltételezett nu. accumbens) csökkent, míg a dorsalis és ventralis területeken nem változott. A legdorsalisabban fekvő caudodorsolateralis palliumban azonban emelkedett az érett (NeuN+) neuronok mennyisége, amely alapján ezen a területen a kikelés után is még intenzíven folyik a neuronok beépülése.

A BrdU és DCX duplajelölt neuronok sűrűsége minden vizsgált területen csökkent, ami alapján arra következtethetünk, hogy a kikelés után kb. 24 órával keletkezett idegsejtek nagyrésze laterálisabb területekre vándorol. Abból kiindulva, hogy a BrdU-NeuN duplajelölt idegsejtek sűrűsége emelkedik a kikelést követő 3. és 10. nap között arra következtethetünk, hogy az emlős hippocampus szemcsesejtjeinél megfigyelt 2-3 hetes érési idővel ellentétben (Deng és mtsai, 2010), fiatal csirkék előagyában az idegsejtek még legalább 7 nap alatt teljesen kifejlődnek és bekapcsolódnak a neurális hálózatba. A DCX-NeuN duplajelölés azokat a fiatal, vándorló neuronokat emeli ki, amelyek éppen érett neuronként letelepednek. A DCX+/NeuN+ idegsejtek sűrűsége emelkedik a nu. accumbensben, a centralis hyperpallium accessoriumban, a caudodorsolateralis palliumban, valamint a rostralis mesopallium dorsaleban. Ezen neuronok sűrűsége pedig csökken a caudalis medialis striatumban és a caudolateralis nidopalliumban, arra utalva, hogy ezen területek expanziója már 1 héttel kikelés után lelassul. A BrdU-DCX-NeuN triplajelölt sejtek sűrűsége az összes vizsgált agyterületen éles emelkedést mutat és azokat a neuronokat emeli ki, amelyek kb. 24 órával kikelés után keletkeztek és 10 nap vándorlás után jutnak az letelepedés és érés fázisába.

Adataink alapján a kikelés után újonnan keletkezett neuronok egy része elhagyja a ventricularis és subventricularis zónát, míg egy másik részük a kamra menti sávban maradva kb. 8 nap alatt letelepszik

5. Ábra (következő oldalon) A BrdU, NeuN, DCX, illetve ezek kombinációinak jelölését mutató sejtek sűrűségének változásai a három megfigyelt síkban és 5 régióban, 24 órával, ill. 7 nappal a BrdU injekciót követően.



és feltehetően bekapcsolódik a neuronális hálózatba. A korábbi vizsgálatokkal ellentétben (Dermon és mtsai, 2002; Nikolakopoulou és mtsai, 2007) a jelen kísérletben vizsgált 17 279 sejtől mindösszesen 18 db (0.1%) volt egyszerre BrdU+ és NeuN+, ami azt mutatja, hogy a 24 órával a kikelés után keletkezett neuronok - az emlősökben is megfigyeltekkel megegyezően -, csirkében sem érnek meg 24 óra alatt. A különböző agyterületek eltérő fejlődési ütemet követnek: az alacsonyabbrendű régiókban a

neuronok (a diencephalon és az agytörzs) döntő többsége kikelés előtt keletkezik, míg a magasabbrendű agyterületeken a kikelés után is aktívan folyik új neuronok bevonása a hálózatba. Ennek megfelelően a diencephalon és az agytörzs területének kikelés utáni növekedése feltehetően már csak a gliasejtek mennyiségi növekedésének tulajdonítható. Az előagyi területeken a vándorló sejtek a nagyobb agyterületeket elválasztó, sejtekben ritkább lemezeket követve érik el a laterálisabban fekvő területeket.

3. A madár nucleus accumbens lokalizációjának pontosítása a csirkeagyban anterográdfolyakövetési technikával

3.1 A téma rövid ismertetése

Mind a passzív ízelkerüléses tanulást, mind a neurogenézist elemző kísérleteink során felmerült, hogy indokolt lenne a madár nu. accumbens közelebbi vizsgálata. A nu. accumbens emlősökben a limbikus striatalis pályarendszer része, limbikus-motoros átkapcsoló terület, amely jelentős dopaminerg beidegézést kap az agytörzsi dopaminerg magvakból (SN és AVT) részt vesz a motiváció, az érzelmek, valamint a jutalmazási rendszer szabályozásában. A ventriculus lateralis mentén helyezkedik el, tehát közvetlenül is érinti a ventricularis és subventricularis zónában aktívan folyó neurogenesis. Madarakban azonban pontos elhelyezkedése nem ismert, amit a különböző csirkeagyatlaszok eltérő nomenklatúrája is jelez. Az immunitokémiai lokalizálására tett kísérletek (Bálint és Csillag, 2007) arra mutatnak, hogy a korábban medialis striatumként meghatározott agyterületnek a kamra mentén elhelyezkedő része valójában a nu. accumbensnek megfelelő funkcionális és hodológiai jellemzőkkel rendelkezik.

A nu. accumbens efferens kapcsolatrendszerének feltérképezését dr. Bálint Eszter végezte. Mezey Szilvia a Pályázat révén a pályakövetés módszertani háttérének megteremtésében, valamint az adatelemzésben vett részt.

3.2 Eszközök és módszerek

A kísérletekhez 12 db 2 hetes Hunnia broiler hibrid csirkét használtunk. Az állatok agyába altatás után Kopf sztereotaxikus berendezés segítségével korábbi vizsgálatokra (Bálint és Csillag, 2007) alapozott koordinátákat használva biotinilált dextransz (BDA) fecskendeztünk (0.1 µl, 10% BDA desztillált vízben). Az injekciót követő 3. héten az állatokat mélyaltatásban transzkardiálisan perfundáltuk, majd az agyakat posztfixálást követően fagyasztó mikrotómon szeleteltük. A BDA-t ABC - nikkellal DAB reakcióval vizualizáltuk. A DAB-jelölt idegelemeket az adott metszetekről készült fényképek alapján, atlaszabrákra vetítve ábrázoltuk.

3.3 Eredmények

A csirke nu. accumbens, az emlősökéhez hasonlóan, három alrégióra osztható: rostrális pólus (AcR), mag (AcC) és héj (AcS). Ezen három terület projekciói nagyrészt átfednek az elő- és a köztiagyban, de jelentősen eltérnek az agytörzsben. Az előagyban a legjelentősebb projekciós területek a ventralis pallidum és a stria diagonalis magja. A nu. basalis az AcR-ből és az AcC-ből kap bemenetet. A lateralis hypothalamus és a lateralis preopticus terület mindhárom alrégióból kap afferenseket. Az AcR és az AcC jelentős beidegzést ad a nu. subthalamicusba. Agy agytörzsben az accumbensből jelölődött rostok legnagyobb sűrűségben a substantia nigra pars compacta részében jelentek meg. A formatio reticularisba, substantia grisea centralisba és a raphe magokba mindhárom alrégió eltérő hangsúllyal projiciál. Az AcR és az AcS erős rostokat küldenek az AVT-be, míg az AcC projekciói leginkább a nu. parabrachialisban, nu. solitariusban, valamint a motoros vagus magokban jelennek meg. Összességében, az afferens pályák elemzése alátámasztotta a nu. accumbensnek korábban immuncitokémiával felállított lokalizációját (Bálint és Csillag, 2007). Az eredmények alapján a madár accumbens hodológiai kapcsolatai jelentős részben megegyeznek az emlősökben megfigyelttel, ami arra utal, hogy ezen agyterület funkciójában is evolúciósan konzervatív.

A zárójelentésben indokolni kell a költségtervtől történő jelentősebb eltéréseket, azok okait és hatását a kutatás folyamatára.

Tudomásom szerint a költségterv és a valós költségek között nem volt jelentős különbség.

Tájékoztatni kell a zárójelentésben az OTKA-t minden olyan körülményről, ami befolyásolta a kutatás eredményes folytatását, befejezését, különös tekintettel a pályázathoz és a kutatási szerződéshez viszonyított esetleges eltérésekre.

A Pályázat ideje alatt kétszer, összesen 3.5 évet töltöttem szülői szabadságon. Mivel az eredményeimen alapuló közlemények várhatóan később kerülnek közlésre (egy cikk elbírálás alatt, egy pedig szerkesztés alatt áll), ezért szeretném kérni, hogy a Pályázat minősítését két éven belül, kiegészítő eljárás keretében, a később megjelent közlemények figyelembevételével módosítsák.

Irodalomlista

1. Bálint E, Csillag A 2007 Nucleus accumbens subregions: hodological and immunohistochemical study in the domestic chick (*Gallus domesticus*). *Cell Tissue Res* 327:221-230.
2. Brown JP, Couillard-Després S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG 2003. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol* 467:1–10.
3. Deng W, Aimone JB és Gage FH 2010. New neurons and new memories: does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 11:339-350.
4. Dermon, C.R. *et al.*, (2002) „Passive avoidance training enhances cell proliferation in 1-day-old chicks”, *E. J. Neurosci.*, 16: 1267-1274;
5. Kampen, van J.M. and Robertson, H.A. (2005) „A possible role for dopamine D3 receptor stimulation in the induction of neurogenesis in the adult rat substantia nigra”, *Neurosci.*, 136(2): 381-386;
6. Kim, K.K., Adelstein, R.S. és Kawamoto, S. (2009) „Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors”, *J. Biol. Chem.*, 284(45): 31052-31061;
7. Kumar, S.S. and P.S. Buckmaster (2007) „Neuron-specific nuclear antigen NeuN is not detectable in gerbil substantia nigra pars reticulata”, *Brain Res.*, 1142: 54-60.

8. Frielingsdorf, H. *et al.* (2004) „No evidence of new dopaminergic neurons in the adult mammalian substantia nigra”, *PNAS*, 101(27): 10177-10182;
9. Howard, C.V. and Reed, M.G. (2005) „Unbiased Stereology”, Garland Science / BIOS Scientific Publishers.
10. Lie, D.C. *et al.* (2002) „The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential”, *J. Neurosci.*, 22(15): 6639-6649;
11. Ling, C. *et al.* (1997) „Neurogenesis in Juvenile and Adult Ring Doves”, *J. Comp. Neurol.*, 379: 300-312;
12. Mullen, R.J., Buck, C.R. and Smith, A.M. (1992) „NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates”, *Development*, 116: 201-211;
13. Nikolakopoulou, A.M. *et al.* (2006) „Passive avoidance training is correlated with decreased cell proliferation in the chick hippocampus”, *Eur. J. Neurosci.*, 24: 2631-2642;
14. Patel, S.N. *et al.*, (1997) „Spatial learning induces neurogenesis in the avian brain”, *Behav. Brain Res.*, 89: 115-128;
15. Puelles *et al.*, *The chick brain in stereotaxic coordinates*, Academic Press, 2007.
16. Yoshimi K., *et al.* (2005) „Possibility for Neurogenesis in Substantia Nigra of Parkinsonian Brain”, *Ann. Neurol.*, 58: 31-40;
17. Zhao, M. *et al.* (2003) „Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra”, *PNAS*, 100(13): 7925-7930.