

Az elért eredmények ismertetése

1. Csirkeembriók gerincvelő telepeiben kimutattuk, hogy az extracelluláris matrix (ECM) egyik organizátor molekulája, a hyaluronsav (HA) elsősorban a postmitotikus állapot előtti osztódó sejtek körül akkumulálódik. Kimutattuk, hogy a HA akkumulációért a hyaluronsav-szintáz 2 és 3 (HAS 2, 3) a felelős, melyek valószínűleg egyben az egyetlen HA kötő sejtfelszíni molekulák is ezekben a sejtekben és ilyen módon az extracelluláris tér és a sejt belseje közötti jelátviteli folyamatokban kulcsszerepet játszanak. Eredményeink alapján a HA valószínűleg non-permisszív a sejtproliferációra, míg a neuronok kezdeti differenciációjára serkentő hatású. A HA kötő chondroitinszulfát proteoglikánok (CSPG) expressziós mintázata nagy átfedést mutatott a HA reakcióval, így feltételezhetően funkcionális kapcsolat van ezen molekulák között. A neuronok sejttestje, dendritjei és az axoneredési domb körül kondenzálódó perineuronális háló vagy net (PNN) az embrionális életben megjelent a gerincvelői motoneuronok körül, szemben az emlős idegrendszerrel, ahol a PNN postnatalisan alakul ki. Ez a lelet arra utal, hogy a fészekhagyó madaraknál a kikeléskor megfigyelhető, koordinált mozgásmintázat háttérében álló neuronhálózat már az embrionális korban stabilizálódik (11., 12. közlemények).

2. Csirke embriók vestibularis magkomplexében kimutattunk a HA expressziós mintázatának változását az egyedfejlődés során. Vizsgálataink azt mutatták, hogy az egyedi vestibularis magok között különbség van a HA időbeli megjelenésében, emellett az életkor előrehaladtával változik a HA reakció intenzitása és lokalizációja. A neuropil területén az E7 naptól kezdődően jelenik meg a HA, míg a PNN a E13-as stádiumtól ismerhető fel: először a nucleus vestibularis medialisban (NVM), majd ezt követően a nucleus vestibularis lateralisban (NVL), a nucleus vestibularis descendensben (NVD) és végül a nucleus vestibularis superiorban (NVS). Az RT-PCR vizsgálatok azt mutatták, hogy a HAS2 és a HAS3 jelen volt a vizsgált stádiumokban és expressziójának erőssége korrelált a HA reakció intenzitásával. Eredményeink rámutatnak a HA jelentőségére a vestibularis neuronhálózatok korai fejlődésében. Az egyes magok közötti különbség az expressziós mintázatban összefüggésben lehet az eltérő funkcióval. A PNN embrionális korban történő megjelenése a vestibularis magokban megfelel a gerincvelői motoneuronok körüli PNN fejlődési dinamikájával, és megerősíti az ott leírt funkcionális értelmezést (31., 33. közlemények).

3. Felnőtt béka vestibularis magkomplexében, a kisagyban és a szemmozgató agyidegi magokban vizsgáltuk az ECM molekulák közül a HA, a CSPG-ok és ezen belül specifikusan az aggrecan, valamint a glikoprotein tenascin-R (TN-R) jelenlétét. A szövettani vizsgálatok és a Western blot analízis valamennyi molekula jelenlétét igazolta a béka agytörzsben. PNN a

NVM és a NVL-ban, a kisagy szemcsesejt rétegében és a szemmozgató motoneuronok körül volt felismerhető, és minden esetben csak a HA reakció mutatott pozitivitást. A neuropilben a reakciók intenzitása és mintázata heterogén megjelenést mutatott a vizsgált területeken. Az eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a regenerációs folyamatokban permisszív tulajdonságú HA jelenléte, és a non-permisszív CSPG-ok hiánya lehet az egyik magyarázata annak, hogy a hidegvérű gerincesek központi idegrendszere, szemben az emlősökével, nagyfokú plaszticitással és regenerációs kapacitással rendelkezik. Az egyes magok közötti különbség az expressziós mintázatban összefüggésben lehet azok eltérő kapcsolataival és részvételükkel a vestibularis kompenzációban. Közleményt nyújtottunk be a J. Comp. Neurol.-hoz: Rácz et al.: Distribution of extracellular matrix macromolecules in the vestibular nuclei and cerebellum of the frog, *Rana esculenta*. (6., 14., 15., 18 közlemények).

4. Vizsgáltuk a HA, a CSPG-ok és ezen belül specifikus reakciókkal a brevican (Br), versican (Ve), valamint a TN-R megoszlását patkány agytörzsben, a vestibularis neuronhálózat elemeiben. A PNN valamennyi reakcióval felismerhető volt a szemmozgató agyidegi magokban, a nucleus ruberben, a NVM, NVL, NVS területén, és a nucleus prepositus hypoglossiban, de a festődési intenzitás és mintázata regionális különbségeket mutatott. A PNN minden esetben negatív volt a NVD-ben. A neuropilben mindegyik reakció, változó intenzitással, pozitivitást mutatott. Az eredmények arra utalnak, hogy az ECM változatos molekuláris összetétele a vestibularis neuronhálózatban magyarázhatja az egyes elemek eltérő részvételét a szemmozgások és a testtartás kontrolljában fiziológias körülmények között és a vestibularis rendszer lézióját követő kompenzációban. Egér és patkány agytörzsben kimutattuk, hogy a CSPG és az ECM termelésében szerepet játszó astroglia markere, a glial fibrillary acidic protein (GFAP) expressziója area-dependens megoszlást mutatott a vestibularis neuronhálózat elemeiben, ami kapcsolatba hozható az adott struktúra eltérő regenerációs kapacitásával (24., 25., közlemények).

5. *In vivo* kísérletekben kimutattuk a HA expresszió kvalitatív és kvantitatív változását a nervus vestibulocochlearis lézióját követően a NVM és NVL területén és az ideg agytörzsi belépési zónájában. Az expresszió eltérő időbeli lefolyása alapján a HA szerepe valószínűsíthető a vestibuláris rendszer kompenzációs és regenerációs folyamataiban (1. közlemény).

6. Patkányban kimutattuk, hogy egyoldali labirintus irtás után a HA és a CSPG expressziós mintázata megváltozik mindkét oldali nucleus vestibularis lateralis területén és a változások időbeli lefolyása korrelációt mutat a léziót követő tünetek kompenzálódásával. Az első postoperatív napon a lézió oldalán a PNN HA festődése csaknem teljesen eltűnt, és a

hetedik napon ismét felismerhető volt. A neuropil területén a harmadik napra mindkét oldalon fokozódott a HA reakció intenzitása és változatlan intenzitású maradt a hetedik napon is. A labyrinthus irtást követően a CSPG reakció negatív volt az operált oldalon a PNN-ben és a neuropil területén is. A reakció a hetedik napon jelent meg ismét mind az ép, mind az operált oldalon. Mivel emlősökben a vestibularis léziót nem követi regeneráció, az ECM molekulák szerepe a plaszticitási folyamatok során lezajló jelátviteli folyamatokban és a meglévő szinaptikus kapcsolatok átrendeződésében bírhat jelentős szereppel (5., 16., 34.

közlemények). Közlemény benyújtva a Neuroscience Letters-hez: Deak et al: Effect of unilateral labyrinthectomy on the molecular composition of perineuronal nets in the lateral vestibular nucleus of the rat. A kézirat "minor revision" értékelést kapott, az átdolgozott kéziratot beküldtük.

7. A vestibularis rendszerhez tartozó agytörzsi és gerincvelői neuronhálózatok közötti kapcsolatok pontosabb megismerése érdekében különböző neuronális jelölési technikákat alkalmaztunk békában fény-és elektronmikroszkópos szinten. Kimutattuk a vestibularis afferensek korábban nem ismert monoszinaptikus kapcsolatát az abducens motoneuronokkal és a trigeminus motoneuronokkal (7., 9., 10. közlemények). Leírtuk, az oculomotorius és a trochlearis mag motoneuronjai közötti dendrodendritikus és dendroszomatikus kapcsolatokat. Kimutattunk a retinalis efferensek monoszinaptikus kapcsolatát az oculomotorius maggal (2., 3., 4., 22. közlemények). Kimutattuk a vestibularis afferensek és az agytörzsi vegetatív központok közötti korábban nem ismert monoszinaptikus kapcsolatokat. Kimutattuk a propriocepcióban fontos szerepet játszó mesencephalicus trigeminus mag monoszinaptikus kapcsolatait a n. IX. és n. X. somatomotoros és visceromotoros neuronjaival (17., 26., 27., 28. 33. közlemény). Leírtuk azoknak az utolsó rendű premotor interneuronoknak a lokalizációját és morfológiáját, amelyek a zsákmányszerző magatartás során a különböző szenzoros bemenetek továbbítását végzik a hypoglossus mag felé (13. közlemény). Kimutattuk a n. V. és a cervicalis hátsó gyöki rostok monoszinaptikus kapcsolatát a n. XII. motoneuronjaival. Kimutattuk, hogy a kétoldali hypoglossus mag kereszteződő dendritjei között dendrodendritikus kapcsolatok vannak, morfológiai specializáció nélkül (21. közlemény). A vizsgálatok új adatokat szolgáltatottak az agytörzsi vestibularis neuronhálózatokban lezajló sensorimotoros integráció korábban nem ismert morfológiai hátteréről. Az eredmények közös konklúziója, hogy a) vestibularis neuronhálózatban az afferens bemenetek a korábban ismert poliszinaptikus kapcsolatok mellett monoszinaptikus kapcsolatokat is létesítenek az efferens neuronokkal, b) a neuronhálózatokban résztvevő motoneuronok közötti dendrodendritikus és dendroszomatikus kapcsolatok más területeken végzett fiziológiai vizsgálatok szerint

ephaptikus ingerület átvitelt tesznek lehetővé. A leírt kapcsolatok szerepet játszhatnak a vestibularis ingerlést követő válaszok gyors és pontos kivitelezésében, ezáltal biztosítva a kompenzatórikus szemmozgásokat, a test egyensúlyi helyzetének fenntartását és a vegetatív működések adaptációját (8. közlemény).

8. Felkérésre megjelent egy könyvfejezet a konfokális mikroszkóp alkalmazási lehetőségéről az agytörzsi neuronhálózatok vizsgálatában (19. közlemény), egy másik pedig a hypoglossus mag szerkezetéről (23. közlemény). Két másik, ugyancsak felkérésre készült könyvfejezet megjelenés alatt van (Birinyi A.: Anatomy of spinal motoneurons. Chapter 1. In: Motor Functions of the Spinal Cord. Ed. A. Birinyi, pp. 1-20 Research Sigpost, in press. Birinyi A.: Organization of spinal motor networks. Chapter2. In: Motor Functions of the Spinal Cord. Ed. A. Birinyi, pp.21 -43. Research Signpost, in press. Matesz, C.: Descending control of spinal motor functions. Chapter4. In: Motor Functions of the Spinal Cord. Ed. A. Birinyi, 80- 100 - Research Signpost, in press. A fejezet részben irodalmi, részben saját korábbi eredmények alapján tárgyalja a motoros szabályozás leszálló kontrollját, különös tekintettel a vestibularis rendszer működésére.

9. Patkány nucleus cochlearis dorsalisának biocytinnel feltöltött és fluorescens festékkel vizualizált sejtjeit konfokális mikroszkópban készített sorozatfelvételekből Neurolucida segítségével rekonstruáltuk. Kvantitatív analízist végeztünk a sejteken 21 morfológiai paraméter multivariáns statisztikai módszerrel történő összehasonlításával, amelynek alapján az óriás és a piramis sejteket egyértelműen tudtuk azonosítani. A folytatásban vizsgáljuk a különböző típusú neuronok körüli ECM összetételét normál állatokban és a belső fül lézióját követő regenerációs folyamat során (29., 30. közlemény). Az eredményeket közlésre benyújtottuk a J. Comp. Neurol.-hoz: Szilvia Kecskes, Áron Kószeghy, Géza Szücs, Zoltán Rusznák, Clara Matesz, András Birinyi: Three-dimensional reconstruction and quantitative morphometric analysis of pyramidal and giant neurons of the rat dorsal cochlear nucleus.

10. Morfológiai bizonyítékot szolgáltatunk a fluoroquinolon antibiotikumok neurotoxikus hatásáról (20. közlemény).

Kérem, hogy a jelentésben foglaltak alapján született minősítést az OTKA kiegészítő eljárásban később módosítsa, figyelembe véve a később megjelent közleményeket.

Eredmények a tudományos utánpótlásban

A beszámolási idő alatt Ph.D. fokozatot szerzett Mészár Zoltán, Rácz Éva és Dr. Deák Ádám. Gaál Botond kutatómérnök 2012-ben megszerzi a Ph.D. fokozathoz szükséges abszolutóriumot és továbbra is a munkacsoportban marad. Kecskés Szilvia molekuláris biológus a 2011/2012-es tanév második félévétől felvételt nyert a Ph.D. képzésre. Két, korábbi tudományos diákköri hallgatónk Ph.D. képzésre felvételt nyert, de nem léptek be a képzésbe, mert rezidensi állást kaptak. A beszámolási időszakban hét tudományos diákköri hallgató és egy középiskolás diák, a „Kutatási Lehetőségek Középiskolásoknak„ program keretében, készített dolgozatot.

Személyi változások

A résztvevő kutatók közül Halasi Gábor György és Dr. Bácskai Tímea senior kutatók valamint Dr. Deák Ádám külföldre távozott. A munkacsoporthoz 2008-ban csatlakozott Gaál Botond kutatómérnök, és 2009-ben Kecskés Szilvia molekuláris biológus. Csatlakozott továbbá a munkacsoporthoz az intézetben dolgozó Dr. Birinyi András egyetemi docens és Wéber Ildikó egyetemi gyakornok.

Összességében a kutatási idő-ráfordítás nem változott.

Felmerült akadályok

A személyi összetétel változása miatt az eredetileg tervezett vizsgálatok menetén módosítani kellett, bizonyos vizsgálatokat pedig el kellett hagyni.

A kutatás előrehaladását nagymértékben akadályozta, hogy az intézet felújítási munkálatai miatt kb. másfél évig a laboratóriumi munkák végzésére, valamint a konfokális és az elektronmikroszkóp használatára minimális lehetőségünk volt.

Költségvetési módosítás

A betervezett UV lézert más forrásból sikerült megvásárolni, ezért költségvetési módosítást kértünk és kaptunk az Élettudományi Kollégiumtól (EIK-648/1/2008.06.04.), és a Neurolucida 3 dimenziós képelemző szoftvert (Fókusz) vásároltuk meg.

A szövettani metszetek készítéséhez szükséges fagyasztó mikrotómot nem lehetett javítani, ennek pótlására történt a gyorsfagyasztó egység beszerzése.

A több évtizede használt termosztátok elromlottak, ezek pótlására történt a beszerzés (2 db inkubátor).

A molekuláris biológiai vizsgálatokhoz szükséges eszközök a laboratóriumban nem álltak rendelkezésre, ezért vásároltuk steril fülkét az RNS izoláláshoz és gél elektroforetikus készüléket a PCR termék futtatásához.

A laboratóriumban korábban nem volt centrifuga, más laboratóriumok készülékeit kellett használni.

Kifizetésre került 20 eFt Király Zoltán részére a számítástechnikai eszközök karbantartásáért és ugyancsak 20 eFt Török Évának a pályázattal kapcsolatos adminisztratív munkáért.