

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Winkler-Ferenczi Zsuzsanna

**A prenatális ultrahang hatása a fejlődő idegsejtek
morfológiájára**

DEBRECENI EGYETEM

IDEGTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2025

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A prenatális ultrahang hatása a fejlődő idegsejtek
morfológiájára**

Dr. Winkler-Ferenczi Zsuzsanna

Témavezető: Dr. Papp Tamás



DEBRECENI EGYETEM

IDEGTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2025

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
I. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
II. CÉLKITŰZÉS.....	13
III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	14
III.1. Állatok.....	14
III.2. Plazmidok.....	15
III.3. <i>In utero</i> elektroporáció.....	15
III.4. Ultrahang expozíció.....	16
III.5. Immunhisztokémia.....	18
III.6. Digitalizáció, neuron rekonstrukció és morfometria.....	19
III.7. RNS izolálás, cDNS transzkripció és qRT-PCR.....	20
III.8. Egész egéragy mintaelőkészítés kontrasztos komputertomográfiához és morfológiai mérésekhez.....	21
III.9. Statisztikai értékelés.....	22
IV. EREDMÉNYEK.....	23
IV.1. A neuronok jelölődése az E14,5. napon történt <i>in utero</i> elektroporációt követően.....	23
IV.2. Az 5. rétegbeli piramis sejtek bazális dendritjeinek száma nő ultrahanginger hatására.....	25
IV.3. A neuronok gyorsan aktiválódnak már egyetlen ultrahang stimulust követően.....	28
IV.4. A GFP-vel jelölt piramis neuronok kifejezik a TRPC4 csatornát.....	33
IV.5. A CA1 neuronok morfológiai jellemzői megváltoznak ismételt ultrahang expozíció hatására.....	35
IV.6. A hippocampális régió morfológiai elemzése mikro-CT-vel.....	37
V. MEGBESZÉLÉS.....	43
V.1. Neuronális differenciálódás ultrahang expozíció után.....	43
V.2. A mechanoszenzitivitás hatása a neuronális nyúlványok növekedésére.....	44
V.3. Az ultrahang stimulus aktiválja a korai válasz géneket és a neurotrofinok felszabadulását.....	45

V.4. Az ultrahang stimulus megváltoztatja az idegi hálózatok aktivitását és morfológiáját.....	46
VI. A KUTATÁS KORLÁTAI.....	49
VII. ÖSSZEFOGLALÁS.....	50
VIII. SUMMARY.....	51
IX. IRODALOMJEGYZÉK.....	53
X. KIEGÉSZÍTŐ INFORMÁCIÓ.....	60
XI. TÁRGYSZAVAK.....	61
XII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	62
XIII. PUBLIKÁCIÓS LISTA.....	63

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ALARA: olyan alacsony dózisu beavatkozást alkalmazunk, amennyire lehetséges - (As Low As Reasonably Achievable)

AO%: területi átfedés %

BDNF: agyi eredetű növekedési faktor

CaM kináz: kalcium/kalmodulin-függő protein kináz

cDNS: komplementer DNS

cing: cingulum

CREB: ciklikus AMP-re válaszoló elemet (CRE) kötő protein

Ct (method): detektálási ciklus-küszöbérték

CT: komputertomográfia

D: az ultrahang transzcuder átmérője

3D, 4D: 3 dimenziós, 4 dimenziós

DAB: 3,3'-diaminobenzidin

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenil-indol

dB: decibel

DG: gyrus dentatus

dhc: commissura posterior (hippocampus)

DICOM: "Digital Imaging and Communications in Medicine"

DNS: deoxiribonukleinsav

DR: dinamikatartomány

E0.5/14.5/18.5: 0,5./14,5./18,5. embrionális nap

EGFP: felerősített zöld fluoreszcens fehérje

ERK: extracelluláris szignál-regulált kináz

EYFP: felerősített sárga fluoreszcens fehérje

FOV: látómező

fp: forceps posterior

GAPDH: gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz

GE: General Electric

GFP: zöld fluoreszcens fehérje

HPRT1: hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz

IgG: immunglobulin G

ISATA: térbeli átlagos, időbeli átlagos intenzitás (“spatial average, temporal average intensity”)

ISPTP: térbeli csúcs, időbeli csúcs intenzitás (“spatial peak, temporal peak intensity”)

K2P: kétpórusú domén káliumcsatorna

kHz: kilohertz

L5: 5. réteg

MANOVA: “Multivariate Analysis of Variance”

MAPK: mitogén-aktivált protein kináz

MHz: megahertz

MI: mechanikus index

MPa: megapascal

mRNS: messenger RNS

mTOR: “mammalian target of rapamycin”

n: szám

NA: numerikus apertúra

NaCl: nátrium-klorid

ns: nem szignifikáns

P3/28/30: posztnatális 3./28./30. nap

PAST: “PAleontological STatistics”

PBS: foszfáttal pufferolt sóoldat

PCR: polimeráz-lánreakció

PFA: paraformaldehid

PI3K: foszfatidilinozitol-3-kináz

qPCR: kvantitatív polimeráz-lánreakció

qRT-PCR: kvantitatív valós idejű polimeráz-lánreakció

RNS: ribonukleinsav

TI: termikus index

TRPA1: tranziens receptor potenciál ankyrin 1 csatorna

TRPC: kanonikus tranziens receptor potenciál csatorna

TRPV4: tranziens receptor potenciál vanilloid 4 csatorna

UH: ultrahang

I. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az ultrahang (UH) egy olyan mechanikai hullám, amelynek frekvenciája meghaladja a 20 kHz-et, az emberi hallásérzékelés felső határát. Ezen frekvenciahatár feletti hanghullámok bár a fül számára nem érzékelhetőek, de az orvosi képalkotásban széles körben használatosak. Az orvosi diagnosztikában az alkalmazott frekvenciatartomány rendszerint 1 és 15 MHz között mozog, amely lehetővé teszi a különböző szövetek részletes tér- és időbeli vizsgálatát, miközben minimalizálja a szövetekre gyakorolt káros hatásokat. Az ultrahang vizsgálat gyors, repetitív és biztonságos módszer az orvosi diagnosztika során, de nagyban függ a vizsgáló személy gyakorlatától.

Az ultrahang alkalmazása különösen fontos a szülészeti-nőgyógyászati területén, ahol nélkülözhetetlen eszköz a magzat fejlődésének ellenőrzésében, valamint az esetleges anatómiai rendellenességek korai felismerésében. A terhesség során az ultrahang vizsgálatok pontos időzítése kiemelten fontos, hiszen a magzat fejlődése a várandósság különböző szakaszaiban eltérő vizsgálati igényeket támaszt. Az első trimeszterben például a fő cél az embrió (vagy a 8. hét után magzat) életképességének megállapítása, a pontos gesztációs kor meghatározása, valamint az esetleges korai rendellenességek kiszűrése. A második trimeszterben már részletes anatómiai vizsgálat történik, amelynek célja a fejlődési rendellenességek kiszűrése, míg a harmadik trimeszterben a magzat növekedésének, fejlődésének, a méhlepény állapotának és a magzatvíz mennyiségének monitorozása kerül előtérbe.

A szülészeti-nőgyógyászati vizsgálat során rendszerint kétféle vizsgálófejet használnak: az első trimeszterben hüvelyi transzducert, míg a későbbi időszakokban konvex transzducert alkalmaznak. Ezek a vizsgálófejek eltérő frekvenciatartományokban működnek: a konvex fejek általában 3-5 MHz-en, míg a transzvaginális változataik 5-7,5 MHz tartományban. A hüvelyi transzducerek magasabb frekvenciája nagyobb felbontást biztosít, ami különösen hasznos az első trimeszteri vizsgálatok során, amikor a magzat és a belső anatómiai struktúrák mérete kisebb. Ezzel szemben a konvex transzducerek alacsonyabb frekvenciájú hullámai mélyebb szöveti penetrációt tesznek lehetővé, ami a későbbi trimeszterekben válik kulcsfontosságúvá a növekvő magzat vizsgálata során.

Az ultrahang vizsgálatok alkalmával elengedhetetlen fontosságú a termikus index (TI) és a mechanikus index (MI) figyelembevétele, amelyek a legfontosabb biológiai hatásokat jelzik, és valós időben láthatóak a vizsgálat során. Az MI a kavitációs jelenségekhez kapcsolódó biológiai hatások kiváltásának képességét méri, míg a TI a szövetek belső hőmérséklet-emelkedését mutatja. (A TI értéke azt becsüli meg, hogy az ultrahang energiája

hány Celsius-fokkal emelheti meg a szövetek hőmérsékletét az adott körülmények között. Például egy $TI = 1$ esetén a szövetek hőmérséklete várhatóan 1°C -kal emelkedhet) (1, 2, 3). Ezen indexek követése biztosítja, hogy a vizsgálatok során a biológiai hatások a megengedett határértékeken belül maradjanak, minimalizálva ezáltal a szövetek esetleges károsodását. Annak érdekében, hogy elkerülhetőek legyenek a nemkívánatos hatások, a nemzetközi ajánlások szerint a vizsgálatok során mind a TI, mind az MI értéke végig 1 alatt kell, hogy maradjon. (1, 4, 5, 6).

Bár ezek a biztonsági határértékek segítenek minimalizálni a kockázatot, fontos szem előtt tartani, hogy még ezen kritériumok teljesülése esetén is, az ultrahang expozíció képes lehet sejtszintű változásokat okozni. Például, az ultrahang képes módosítani a neuronális morfológiát és befolyásolhatja a dendritfa fejlődését mind *in vitro* (7), mind *in vivo* körülmények között (8, 9).

Egy *in vitro* kutatás eredményei szerint a pulzatis ultrahang expozíció átmeneti morfológiai változásokat idézhet elő az idegrendszerben, például az idegsejtek nyúlványainak visszahúzódását és a sejttest zsugorodását, valamint a sejttest eltolódását okozhatja. A kiváltott hatás mértéke az ultrahang intenzitásától függ, az akusztikus csúcnyomás pedig döntő tényező a folyamatban. Úgy tűnik, hogy a direkt mechanotranszdukció kulcsszerepet játszik az észlelt változásokban, mivel a feszülés-aktivált ioncsatornák blokkolása jelentősen csökkenti az ultrahang által kiváltott morfológiai változásokat. Kimutatták továbbá, hogy a Ca^{2+} fontos szerepet játszik a transzdukciós folyamatban, mivel az extracelluláris Ca^{2+} megkötése kelátképző anyaggal hasonló módon gátolja a fent említett biológiai hatásokat (7). A morfológiai változások nem bizonyultak destruktívnak, mivel az expozíció után neurit kinövés és neuritogenezis volt megfigyelhető a neuritokat hordozó és a neurit nélküli idegsejtekben egyaránt.

Egy *in vivo* kísérlet során, amikor felnőtt (a kísérlet kezdetekor 4 hónapos) egerek agyát repetitív, 1 MHz-es ultrahang stimulusnak tették ki, 3 hónap elteltével azt tapasztalták, hogy míg az apikális dendritek esetében a kontrollcsoportban a csomópontok számának, a dendritek teljes hosszának és a 3D dendrit térfogatnak a csökkenése következett be, ez a csökkenés az ultrahanggal kezelt egerek CA1 piramissejtjein nem volt megfigyelhető. Ezen kísérlet eredményei alapján tehát az ultrahang hatásosnak bizonyult az apikális dendritfa életkorhoz köthető leépülésének megelőzésében (9). Ezek a hatások ismétlődő ultrahang-expozíció során fokozódnak, ami a neuritok átlagos hosszának jelentős növekedését és a neuroblasztok proliferációját idézheti elő (10, 11).

Az ultrahang vizsgálatok időtartama általában 10-15 perc, azonban egy 3D vagy 4D "babamozi" további 30-40 perccel növelheti az eljárás hosszát (4, 5, 12). A 3D-s és 4D-s ultrahang vizsgálatok lehetőséget adnak arra, hogy a szülők már jóval a megszületés előtt megismerjék magzatukat, és az orvosok számára is lehetővé teszik a még precízebb diagnózis felállítását. Bár a diagnosztikai ultrahangot általában biztonságosnak tartják populációs szinten, egyes publikációk szerint előfordulhatnak enyhe mellékhatásai, például a késleltetett beszédfejlődés, a balkezesség gyakoribb előfordulása és a nagyobb születési súly (13, 14, 15).

Fontos megjegyezni, hogy egy nagyszámú tanulmányt áttekintő „review” közlemény adatai szerint a terhesség alatt végzett ultrahang vizsgálatokkal összefüggésben nem mutattak ki negatív anyai vagy perinatális kimenetelt, azok nem okoztak károsodott fizikai vagy neurológiai fejlődést, továbbá nem növelték a gyermekkori rosszindulatú daganatok, a normálisnál alacsonyabb intellektuális teljesítmény vagy mentális betegségek kockázatát (14). Mindazonáltal, a kutatók továbbra is folyamatosan vizsgálják az ultrahangnak az emberi fejlődésre gyakorolt hosszú távú hatásait, különös tekintettel a finom és nehezen mérhető változásokra, amelyek esetleg csak évekkel később válnak nyilvánvalóvá.

A terhesség második és harmadik trimeszterében a szülészeti ultrahang feltehetően mechanikusan stimulálja a fejlődő agy neuronjait, különösen a kéregben és a hippocampusban. Ez az időszak kiemelten fontos a neuronális hálózatok kialakulása és az axo-dendritikus növekedés szempontjából, például a limbikus rendszerben, amely kulcsszerepet játszik a tanulás, a memória, a motiváció és az érzelmek feldolgozásában (16, 17).

A neurogenesis folyamata egy jól meghatározott időbeli és térbeli mintát követ (18). Több mint egy évszázada ismert, hogy az emlősök agykérge hat rétegből áll. A neokortex jellemzője a projekciós neuronok belülről kifelé történő elrendeződése, ahol a legrégebbi neuronok a legmélyebb, a legfiatalabb neuronok pedig a legfelületesebb rétegekben helyezkednek el, ennek megfelelően a 2. réteg a legfiatalabb idegsejteket tartalmazza, míg a 6. réteg a legkorábban születetteket. A belülről kifelé rétegződés azt jelenti, hogy minden frissen született serkentő neuronnak ki kell vándorolnia a periventrikuláris térből, majd a fejlődő fehérállományon keresztül migrálnia kell a korábban született neuronokon is. A desztinációjának megfelelően letelepszik, majd terminális differenciálódáson megy keresztül, és létrehozza szinaptikus kapcsolatait. A migráció elindításáért egy speciális „úttörő” neuron populáció, az úgynevezett Cajal-Retzius (CR) sejtek felelnek, amelyek a Reelint termelik, ami nélkülözhetetlen a szabályos migráció irányításához. A CR-neuronok folyamatosan kifelé nyomódnak, miközben a kéreg növekszik, így kivételt képeznek a kéreglemez többi részének belülről kifelé történő születési sorrendje alól. Az első vándorló neuronok rétegét subplate-nek

(SP, 6b réteg) nevezik, míg a következő rétegek (6, 5, 4 stb.) fölötté halmozódnak fel. Míg a serkentő neuronok periventricularisan születnek, és ezt követően szekvenciálisan belülről kifelé építik fel a cortexet radial irányú migrációval, a kérgi gátló neuronok progenitor sejtjei a mediális ganglion eminenciában helyezkednek el, a posztmitotikus leánysejtek pedig a szubventrikuláris zónában vagy a pia mater alatti kortikális lemez felé vándorolnak tangencionálisan (19).

Kimutatták, hogy az ultrahang elősegíti a neuroprogenitor sejtek proliferációját, miközben korlátozza a piramissejtek migrációját a fejlődő agykéregben (11). Egy *in vitro* kísérlet során (11) a diagnosztikai ultrahang tartománynál kissé magasabb (6,7 MHz) frekvenciát alkalmazva azt tapasztalták, hogy a migráció kezdetekor megjelölt, majd egy nappal később ultrahang stimulusnak kitett neuronok lelassulnak, és néhányuk a fehérállományban marad, vagy a mélyebb kérgi rétegekben akad el. Kiemelendő, hogy a kísérlet során több különböző időtartamú ultrahang stimulust alkalmaztak, azonban szignifikáns eltérést csak 30 perces vagy annál hosszabb stimuláció esetén észleltek. Ezenkívül az alacsony intenzitású (<3 W/cm²) ultrahang kezeléssel kimutatták, hogy mind *in vitro* (20), mind *in vivo* (21) elősegíti a neuronális őssejtek (progenitorok) differenciálódását és túlélését.

A migrációt és a rétegek kialakulását követően kulcsfontosságú, hogy a neuronok dendritjei megfelelően növekedjenek és ágazzanak el, mert enélkül nem lenne lehetséges a neuronális hálózatok megfelelő kialakulása és működése. A dendritek arborizációja, melyre mind belső, mind környezeti tényezők hatással vannak, jelentősen befolyásolja a neuronok szinaptikus bemeneti és membrán jellemzőit. Szubcelluláris szinten az ultrahang – a fent említettek szerint - átmeneti és gyors változásokat idézhet elő a neuritok növekedésében neuronális sejtenyészetekben (7), mechanoszenzitív receptorokon és ioncsatornákon keresztül.

A tranziens receptor potenciál csatornák (TRPC-k) széles körben jelen vannak a fejlődő egér agyban, különösen a kortikális lemezben (22, 23). A tranziens receptor potenciál (TRP) szupercsalád nem-szelektív kationcsatornák csoportjából áll. A klasszikus TRP-k (TRPC-k) családjának hét tagja közül (TRPC1-7) valószínűleg a TRPC4 játszik szerepet a neuronális jelátvitelben (23). Korábbi tanulmányok szerint a TRPC4 aktiválható ultrahanggal 2 MHz-nél magasabb frekvenciákon (24), ami arra enged következtetni, hogy részt vehet a fejlődő neuronok ultrahang által közvetített jelátvitelében. Ezt a hipotézist erősíti az a megfigyelés is, hogy azok az állatok, amelyeknél hiányzik a TRPC4 mechanoszenzitív ioncsatorna, szignifikánsan csökkent érzékenységet mutatnak az ultrahang-stimulációra, ami azt jelzi, hogy a mechanoszenzitív ioncsatornák fontos szerepet játszanak az ultrahang stimuláció

mechanizmusában. Egy korábbi kísérlet során alacsony nyomású ultrahanggal érzékenyített idegsejteket aktiváltak a fonálféregben (*Caenorhabditis elegans*), a vad típusú állatok érzéketlennek bizonyultak az alacsony nyomású ultrahangra, ezzel szemben megállapították, hogy a TRPC-4 mechanotranszdukciós csatorna pórusképző alegységének normálnál nagyobb mértékű expressziója érzékenyíti az idegsejteket az ultrahangos stimulusra, ami viselkedési válaszokat eredményezett (24).

A TRPC-k szabályozzák a neuroszekréciót, a hosszú távú potenciációt (LTP) és a szinaptikus plaszticitást egyaránt. Említésre méltó továbbá, hogy különböző neuropatológiai állapotokban a TRPC csatornákon keresztüli Ca^{2+} beáramlás zavarait észlelték. Mint nem szelektív kation csatorna, amely elsősorban az endoplazmatikus retikulum membránjában található, a TRPC4 funkciója aktiválódáskor a citoplazma Ca^{2+} -szintjének emelése (25). A TRPC4 erősen expresszálódik ingerelhető sejtekben és részt vesz az idegi sérülésekre adott válaszban, a neuritkinövés, valamint az idegi exocitózis szabályozásában, emellett együtt expresszálódik a TRPC5-tel a hippocampus CA1 piramissejtjeiben, amely fontos szerepet játszik az idegi Ca^{2+} homeosztázisban (25). Érdeemes megjegyezni, hogy a lokális intracelluláris Ca^{2+} jelátvitel szerepet játszik a dendritek növekedésének és elágazásának befolyásolásában, valószínűleg a CREB és a CaM kináz érintő útvonalakon keresztül (26). A CaM kináz és CREB célgénjei, amelyek dendritikus növekedést közvetítenek, nem pontosan ismertek, de fontos potenciális célpont az agyi eredetű neurotróf faktor (BDNF). Kimutatták, hogy a CaM kináz CREB-függő mechanizmussal képes BDNF expressziót indukálni, amely a kérgi neuronokban fokozott dendritnövekedéshez vezethet. Így a Ca^{2+} és a CaM kináz által kiváltott dendrit növekedést a BDNF közvetítheti (26).

A TRPC-k aktiválása a BDNF mellett a c-Fos korai válaszgén emelkedett szintjéhez vezet, ami fokozott neuronális aktivitásra utal (8, 24, 27). A korai válaszgének transzszinaptikus stimulációval történő szabályozásának molekuláris alapjai csak részben ismertek. A Ca^{2+} beáramlása a feszültségfüggő Ca^{2+} csatornákon keresztül és az aktív Ca^{2+} -kalmodulin komplex kialakulása valószínűleg a depolarizáló ingerek által kiváltott folyamat első lépése. Figyelemre méltó, hogy a c-fos indukciót a külső Ca^{2+} kelátképzés, a Ca^{2+} csatornák specifikus inhibitorai és a kalmodulin antagonisták blokkolják.

A rendelkezésre álló publikációk alapján a diagnosztikus prenatális ultrahang vizsgálat biztonságos mind az anya, mind a magzat számára. A jelenleg rendelkezésre álló eredményeket azonban érdemes óvatosan értelmezni. A biztonság azt jelenti, hogy nincsenek felismert káros hatások, de fontos szem előtt tartani, hogy az ultrahang expozícióból származó hatások rendkívül diszkrét lehetnek, és sok évvel az expozíció után jelentkezhetnek. Az ultrahangnak

az emberi fejlődésre gyakorolt hatásával kapcsolatos kérdések megválaszolásához a jövőben szükséges lenne az expozíciónak kitett és nem kitett csecsemők fejlődésének hosszú távú követése. Ezenkívül a meglévő publikációk nem feltétlenül értékelték a prenatális ultrahang által okozott összes lehetséges biológiai hatást. A jövőbeni vizsgálatok olyan hatásokat tárhatnak fel, amelyeket ezidáig még nem ismertek fel. Ezért, amint azt az ALARA (As Low As Reasonably Achievable) elv kimondja, a jelenleg rendelkezésre álló bizonyítékok alapján jelenleg is megfontolandó, hogy a pácienseket a diagnosztikai információk megszerzéséhez szükséges legkevesebb ultrahang hatásnak tegyük ki (14).

II. CÉLKITŰZÉS

Korábbi tanulmányok alapján célul tűztük ki, hogy a magzati diagnosztikában használt ultrahang hatásait vizsgáljuk *in vivo* egérmodellben, ennek során a mechanoszenzitív TRPC4 receptor expresszióját vizsgáltuk a fejlődő kérgi neuronokban, az ultrahang expozíció hatását a retrosplenialis cortex piramis 5. rétegének neuronjaira (8).

Kutatásunk második szakaszában (28) a repetitív magzati ultrahangnak a hippocampus CA1 piramissejtek morfológiájára gyakorolt hatását, valamint hosszú távon a teljes agy térfogatára és súlyára kifejtett hatásait tanulmányoztuk, továbbá a hippocampus morfológiai jellemzőit elemeztük.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

III.1. Állatok

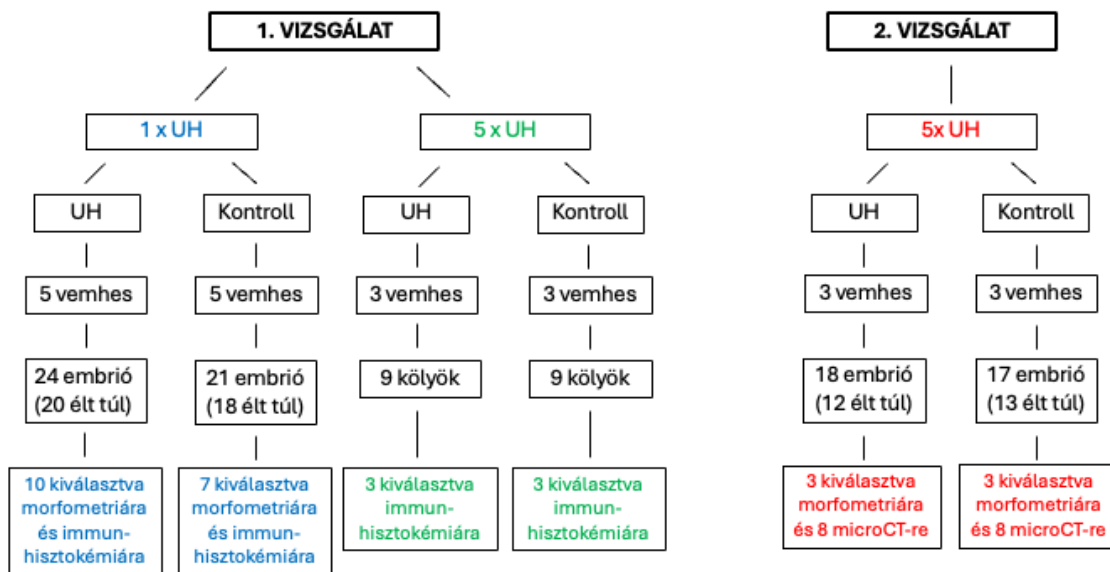
A kísérletek során az *in utero* elektroporációhoz vemhes CD1 (ICR, Charles River, Németország) egereket használtunk.

Az első vizsgálatban az egyszeri ultrahang stimulus hatásainak vizsgálatához 10 vemhes egeret használtunk, melyek közül 5 egér 24 elektroporált embriót hordozott, közülük 20 maradt életben, 10 lett kiválasztva morfometriára és immunhisztokémiára az ultrahang stimuláció után. A fennmaradó 5 vemhes egér 21 elektroporált embriót hordozott, 18 maradt életben, 7 embrió lett kiválasztva morfometriai és immunhisztokémiai vizsgálatra, amelyek kontrollként szolgáltak. Az ötszöri, repetitív ultrahang hatásainak felméréséhez 3-3 vemhes egeret használtunk mind az ultrahanggal stimulált, mind a kontrollcsoportban, így mindegyik csoportban 9 kölyök (3-3 minden vemhes egértől) született.

A második vizsgálatban 3 vemhes egeret, összesen 18 elektroporált embriót (12 maradt életben) vetettünk alá ultrahang stimulációnak. Ezt követően a boncolás után összegyűjtöttük azokat az agyakat, amelyek erős GFP jelölődést mutattak (a GFP jelölés részleteit lásd alább a „Plazmidok” c. részben). A GFP jelölődési minta alapján 3 agyat választottunk ki morfometriai elemzésre P28-on. A kontroll kísérletekhez 3 vemhes egeret használtunk, amelyek 17 elektroporált embriót hordoztak (13 maradt életben), és 3-at választottunk ki a morfometriához a GFP jelölődési mintázat alapján. Továbbá 8 kontroll és 8 ultrahanggal stimulált egyéves állat központi idegrendszerét vizsgáltuk mikro-CT-vel. A vizsgálat során a kontrollcsoport olyan állatokból állt, amelyek ugyanazon eljárásokon estek át, mint az ultrahanggal kezelték, azonban nem voltak kitéve ultrahang stimulusnak. Mind a kezelt, mind a kontrollcsoportban csak nőstény állatokat vizsgáltunk a hím és nőstény egerek eltérő agymérete miatt, ami kizárta mindkét nem alkalmazását kísérleteinkben. A kísérletek során használt állatok listáját az **1. ábra** összegzi.

Mindkét kísérletben az embrionális kor meghatározása a párzási dugók megfigyelésén alapult, ezt jelöltük meg a zigóták 0,5. embrionális napjának (E0,5). Az állatok vizsgálatát és elhelyezését a Debreceni Egyetem Állatgondozói Bizottsága (15/2020/DEMAB jóváhagyási szám) előírásai szerint, valamint az Európai Unió nemzeti törvényei és irányelvei szerint végeztük (2010/63/EU irányelv).

1. ábra



1. ábra: A két vizsgálat során használt állatok listája.

III.2. Plazmidok

A kollaborációs laboratórium egy expressziós vektort (pCALN-loxp-GFP-loxp-CS3) tervezett és szerkesztett, amely az EGFP szekvenciát kódolja, és egy cre-rekombinázzal GFP-t expresszál CAG promóter alatt. A cre-rekombinázt tartalmazó pCAG-cre vektort Dr. J. Miyazaki (Oszakai Egyetem Orvosi Karának Össejt-szabályozási Kutatási Osztálya, Osaka, Japán) biztosította.

Ezenkívül az első vizsgálatban Cytbow vektort, egy multicisztronikus plazmidot is alkalmaztunk, mely vektor három fluoreszcens riporter (tdTomato, türkiz és EYFP) expresszióját teszi lehetővé, mindegyiket különböző lox szekvenciák szabályozzák (29). Ezt a vektort Karine Louiller (Vision Institute – INSERM, Párizs, Franciaország) biztosította számunkra. Vizsgálatunkban a Cytbow expressziót a pCAG-Cre vektor használatával aktiváltuk.

III.3. *In utero* elektroporáció

Első vizsgálatunkban az ultrahang expozíció neuronális morfológiára gyakorolt hatását az egér retrosplenialis kérgében a GFP és Cytbow-jelölt 5. rétegbeli piramis neuronokban értékeltük. A második vizsgálatban a GFP-vel jelölt CA1 piramis neuronok morfológiai változásait vizsgáltuk ugyanezzel a módszertannal. A piramissejtek morfológiájában rejlő

variabilitás hatásának minimalizálása érdekében azokat a sejteket hasonlítottuk össze, amelyek ugyanazon időintervallumon belül születtek, ugyanabba a rétegbe vándoroltak, és hasonló differenciálódási állapotot mutattak. Ennek eléréséhez fluoreszcens riporter géneket tartalmazó plazmidok méhen belüli elektroporációját alkalmaztuk, mivel az elektroporált plazmid csak a sejtciklusból az elektroporációval egyidejűleg kilépő posztmitotikus neuronokban okoz génexpressziót. A retrosplenialis kéreg 5. rétegbeli piramis neuronok jelölésére méhen belüli elektroporációt végeztünk az E14,5-en a Navarro-Quiroga és munkatársai által leírt eljárást követve (30). Az embrionális 14,5. napon a vemhes egereket nátrium-pentobarbitállal (50 mg/kg) mélyaltattuk, majd hasi feltárásból szabaddá tettük a méhszarvaikat, és az embriók jobb oldalkamrájába plazmidot tartalmazó oldatot fecskendeztünk. Ezt követően egy Electro Square Porator (BTX, ECM830) segítségével elvégeztük az elektroporációt. Az eljárás során az embriókat az anódhoz képest enyhén ferde szögben (15° – 30°) helyeztük el a méhben, az interaurális vonal szolgált referenciasíkként (0°). Az elektromos impulzusok továbbítása csipesz típusú elektródákkal (BEX, LF650P5) történt a következő módon: 5 impulzus 40 V-on, egyenként 50 ms hosszán, másodpercenként alkalmazva. Az anód és a katód távolságát 6 mm-re állítottuk be, ami 67 V/cm elektromos térerősséget eredményezett. Ezt követően a hasüreget átöblítettük és a méhet a visszahelyeztük, végső lépésként a hasfalat kétrétegű varrattal zártuk.

III.4. Ultrahang expozíció

Mindkét kísérlet során négy nappal az *in utero* elektroporációt követően (E18,5. napon) az egereket mélyaltatásba helyeztük Na-pentobarbitállal (50 mg/kg dózisban), majd 10 percen keresztül ultrahang stimulusnak tettük ki. A humán diagnosztikában is használt GE Logiq V2 ultrahang készülék mindvégig 3 MHz-es frekvencián működött, és mind a mechanikus, mind a termikus index 1,0 alatt volt (MI = 0,9; TI = 0,8). A vizsgálófej további paraméterei az alábbiak voltak: D: 17 mm, DR: 69 dB, AO%: 100. 4C-RS konvex transzducert alkalmaztunk (2,0-5,0 MHz frekvencia tartomány, 128 elem, 60 mm konvex sugár, 55° FOV, és $18,3 \times 66,2$ mm-es alapterület). A B módú képalkotási frekvencia 2,0–5,0 MHz (2,0, 3,0, 4,0 és 5,0 MHz), míg a harmonikus képalkotási frekvencia 3,0–5,0 MHz (3,0, 4,0 és 5,0 Mhz) volt. A kalkulált negatív akusztikus nyomás csúcértéke 1,557 MPa, az átlagos intenzitás 56 mW/cm^2 volt az expozíció alatt. A vizsgálófejet AquaUltra Basic ultrahang géllal vontuk be (Ultragel, Budapest, Magyarország). A méhen belüli ultrahang expozícióhoz a gélt finoman a vemhes állatok hasára, a szülés utáni kezelésekhöz pedig közvetlenül az egerek koponyájára helyeztük.

Az első prenatális ingert az embrionális 18,5. napon adtuk le, majd ezt négy további stimuláció követte a születés utáni első négy hétben, hetente egyszer. Az E18,5-en a kezelés alatt a fókusz a vemhes állatok hasának középvezetékén tartottuk, hogy minden embrió esetében egyenletes expozíciót biztosítsunk. A posztnatális kezeléseket során az állatok kis koponyájára való tekintettel nem fókuszált ultrahang stimulust alkalmaztunk. A kontrollcsoportba tartozó állatokat azonos eljárásoknak vetettük alá, beleértve az érzéstelenítést és az *in utero* elektroporációt, kivéve a qRT-PCR-hez használt mintákat. Az ultrahang transzducert a kontroll állatok hasára, illetve a posztnatális szakban a koponyára helyeztük anélkül, hogy ténylegesen ultrahang inger érte volna őket, tükrözve az ultrahanggal stimulált egyedek körülményeit.

Második kísérletünk során a mikro-CT analízishez az ultrahanggal kezelt és a kontrollcsoportból 8-8 állatot 12 hónapig hagytunk túlélni, mielőtt túlaltattuk őket. Ezt követően transzkardiálisan perfundáltuk az állatokat 4% PFA-val, majd sóoldattal, végül az agyakat izoláltuk.

III.5. Immunhisztokémia

Első vizsgálat sorozatunk során immunfluoreszcens jelölést alkalmaztunk a GFP jel rögzítésére és a TRPC4, c-Fos és BDNF azonosítására ultrahang kezelésnek alávetett egéragyakban. Az első vizsgálatban az E18,5 embriók, valamint a P3 és P30 egérkölykök, a második kísérletben a P28 egerek teljes agyát óvatosan eltávolítottuk, majd 0,1 M foszfáttal pufferolt sóoldatban (PBS, pH 7,4) lévő 4%-os paraformaldehydbe merítve fixáltuk egy éjszakán át 4 °C-on. Ezt követően az agymintákat PBS-sel mostuk, 4%-os agarózba ágyasztuk, és vibratóm segítségével (Leica VT 1000 S, Biosystems, Wetzlar, Németország) 100 µm vastag koronális metszeteket készítettünk. A metszeteket elsődleges antitesttel 2 napig 4 °C-on, majd egy éjszakán át 4 °C-on másodlagos antitesttel inkubáltuk, az antitesteket 0,3 M NaCl-ot és 0,3% Triton X-100-at tartalmazó PBS-ben (pH 7,4) hígítottuk. Az inkubálást követően három 15 perces PBS-mosást végeztünk.

Az első vizsgálatban felhasznált elsődleges antitesteket az 1. táblázat részletezi. A fajspecifikus másodlagos antitesteket számarban vagy kecskében állították elő, majd azokat Alexa Fluor 488, 555 és 647-tel jelöltük (Invitrogen, Carlsbad, CA, Egyesült Államok).

A második vizsgálatban a következő primer és másodlagos antitesteket alkalmaztuk: 1:2000, ab13970 (Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság), és csirke elleni Alexa Fluor-488, 1:500 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

A metszeteket mindkét esetben sejtmag-specifikus DAPI-val (Sigma, D9542, 100 ng/ml) inkubáltuk 2 órán át szobahőmérsékleten, hogy elősegítsük a rétegek határainak az azonosítását. Ezt követően a metszeteket Hydromount-tal fedtük (National Diagnostics Atlanta, GA, USA).

A második vizsgálat során a fluoreszcens képek elkészülését követően az immunfluoreszcens jelet DAB-jelölt mintákká transzformáltuk (1. melléklet). A fedőlemezeket PBS-ben eltávolítottuk, majd a metszeteket egy éjszakán át számar biotinilált anti-csirke IgG-vel (1:200, Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, USA), majd avidin-biotin komplexszel (1:200, Vector Labs, CA, USA) inkubáltuk 2 órán keresztül. A vizualizációt a DAB peroxidáz szubsztrát készlettel (Vector Labs, CA, USA) végeztük a gyártó protokollja szerint.

1. táblázat

Antitest	Specifitás	Gazda faj	Hígítás	Forrás
ab13970	Recombinant full-length protein corresponding to GFP	Chicken	1:2,000	Abcam
SAB2108245	Synthetic peptide directed toward the middle region of human TRPC4	Rabbit	1:100	Sigma-Aldrich
MAB248	Recombinant human BDNF corresponding to the following epitope sequence: Arg128–Arg247	Mouse	1:25	R&D Systems
sc-52	N-terminus of c-Fos of human origin	Rabbit	1:25	Santa Cruz Biotechnology
A-11039	Goat anti-chicken IgY (H + L) secondary antibody, Alexa Fluor 488	Goat	1:500	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific)
A-31572	Donkey anti-Rabbit IgG (H + L) highly cross-adsorbed secondary antibody, Alexa Fluor 555	Donkey	1:500	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific)
A-11001	Goat anti-mouse IgG (H + L) cross-adsorbed secondary antibody, Alexa Fluor 488	Goat	1:500	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific)
A-31571	Donkey anti-mouse IgG (H + L) highly cross-adsorbed secondary antibody, Alexa Fluor 647	Donkey	1:500	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific)

1. táblázat: Az első vizsgálatban használt antitestek listája

III.6. Digitalizáció, neuron rekonstrukció és morfometria

Első vizsgálatunkban a retrosplenialis kéreg 5. rétegbeli piramisisejtek 3D rekonstrukcióját végeztük Neurolucida szoftver (MBF Bioscience, Williston, VT, Egyesült Államok) segítségével a konfokális képekből. A konfokális szeletek 0,5 μm vastagok voltak, ezeket 40-szeres (Olympus, UplanFLN, NA: 1,30) olajimmerziós objektívvel rögzítettük FV3000 mikroszkóp segítségével (Olympus, Tokió, Japán). A kontroll és ultrahanggal kezelt állatok GFP-vel és Brainbow-val jelölt neuronjain (20-20 GFP-vel jelölt és 15-15 Brainbow-jelölt piramisisejt) manuális 3D rekonstrukciót végeztünk. A sejttestek kontúrjait precízen körberajzoltuk a képeken Z síkban. A neuronális dendriteket pontosan rekonstruáltuk, figyelembe véve a nyúlványok átmérőjét az egyes rekonstruált pontokban. A retrosplenialis kéregben az 5. réteg legmélyebb részén található piramisisejteket kifejezetten úgy választottuk ki, hogy csak az 5. rétegben lévő sejtek kerüljenek összehasonlításra. A GFP-vel és Brainbow-val jelölt piramisisejtek adatait összességében értékeltük, mivel nem volt megfigyelhető különbség a különböző plazmidokkal jelölt piramis neuronok között. A rekonstrukciókból származtatott morfometriai paraméterek közé tartozott a neuritok teljes száma, teljes hossza, elágazási pontok (csomópontok) száma és a dendritek szegmenseinek hossza. A kielemezett sejtek kiválasztásakor az alábbi kritériumokat vettünk figyelembe: 1) a jelölt régióban azonos lokalizáció, 2) erős GFP jelölődés, 3) egymástól távoli elhelyezkedés, amelynek a rekonstrukciós folyamat szempontjából volt jelentősége, és 4) a dendritek nyomon követhetősége a szomszédos szeletekben.

A második kísérlet során szintén 0,5 μm vastag konfokális képeket készítettünk azonos kamerával és mikroszkóppal beállítással. Az immunfluoreszcens mintákon Imaris szoftvert (ver 9.5 Bitplane, Oxford Instruments, UK) használtunk az apikális és bazális dendritek másodlagos ágainak követésére. Minden rekonstrukciót egy a szakterületben jártas kutató is

ellenőrzött. A DAB-ozott minták (1. melléklet) esetében specifikusan csak CA1 piramis sejteket (17 kontroll és 16 ultrahanggal kezelt) választottunk ki a NeuroLucida szoftverrel való 3D rekonstrukcióhoz. Az alkalmazott mérésekkel kapcsolatos részletes információk a NeuroLucida kézikönyvben találhatóak (ver 11.07, MBF Bioscience, Williston, VT, Egyesült Államok). A neuronok sejttestjeit aprólékosan körberajzoltuk Z síkban, és kiemelt figyelmet fordítottunk a dendritek rekonstrukciójára, különös tekintettel azok átmérőjére. A rekonstrukciókból származó morfológiai paraméterek közé tartozott a dendritek összszáma, legmagasabb elágazódási szám, az elágazások száma, átlagos szegmenshossz, átlagos szegmens kanyargósság, átlagos szegmens átmérő, dendrithossz, átlagos terminális távolság és átlagos dendrithossz. Az Imaris szoftver segítségével kielemeztük az ismétlődő ultrahang dendritek másodlagos ágaira gyakorolt hatását. Fontos megjegyezni, hogy az elemzést végző személy nem tudta, hogy milyen mintákat rekonstruált.

III.7. RNS izolálás, cDNS transzkripció és qRT-PCR

Összesen 9 egész egerágy mintát használtunk 3 alomból, ezeket a mintákat 60 perccel az embrionális 18,5. napon (E18,5) végzett ultrahang vizsgálatot követően gyűjtöttük. A 3 alomból származó, 9 mintát tartalmazó kontroll állatokat ugyanolyan kezelési eljárásoknak vetettük alá, mint az ultrahanggal stimulált csoportot, azonban tényleges ultrahang stimulusnak nem voltak kitéve. A teljes RNS extrakciót 30 mg egerágy szövetből TRIzol reagenssel (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, Egyesült Államok) végeztük. A DNS-emésztési lépéssel kiegészített standard izolálási protokoll során 30 mg agyszövetet izoláltunk, majd kvantifikáltunk és minősítettünk NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok). Ezt követően a teljes RNS-ből 1000 ng reverz transzkripción ment keresztül cDNS-sé Tetro cDNS Synthesis Kit (Bioline, Alvinston, Kanada) alkalmazásával, a gyártó útmutatásait követve. Az ezt követő PCR-amplifikációt a SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, Egyesült Államok) és a CFX96 Real-Time System C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories) segítségével végeztük, a következő PCR-körülmények között: 1 ciklus 2 percig 50 °C-on és 3 percig 95 °C-on, majd 39 ciklus 15 másodpercig 95 °C-on és 1 percig 60 °C-on, és 81 ciklus 1 percig 55-98 °C-os hőmérséklet-tartományban. Specifikus primerpárokat a BDNF-hez (előre irányuló GGCTGACACTTTTGAGCACGTC, fordított CTCCAAAGGCACTTGACTGCTG), a HPRT1-hez (előre irányuló CAGTCCCAGCGTCGTGATTA, fordított TGGCCTCCCATCT CCTTCAT) és a GAPDH-hoz (előre irányuló GTCATCCCAGAGCTGAACGG, fordított

TACTTGGCAGGTTTCTCCAGG) (OriGene Tech, Rockville, MD, Egyesült Államok) használtunk. A génexpresszió mennyiségi meghatározását 40-Ct módszerrel végeztük, a BDNF expressziót a HPRT1 és a GAPDH housekeeping génekre normalizáltuk. Megjegyzendő, hogy a potenciális szennyeződések kimutatására nem használtunk templat kontrollokat (NTC, RT-NTC, NRT) a reakció minden szakaszában.

III.8. Egész egéragy mintaelőkészítés kontrasztos komputertomográfiához és morfológiai mérésekhez

8-8 állatot (5 alkalommal ultrahang kezelésnek kitett és kontrollcsoport) egyéves túlélés után, Na-pentobarbitállal (50 mg/kg) mély érzéstelenítésben túlaltattunk. Az eutanáziát követően az állatokon 4%-os paraformaldehiddel (PFA) és sóoldattal transzkardiális perfúziót végeztünk, majd agyukat 4%-os PFA-ban egy hétig fixáltuk 4°C-on. Ezt követően az agyminták két mosási cikluson estek át foszfáttal pufferolt sóoldatban (PBS) egyenként 10 percig, majd dehidratálást végeztünk abszolút etanolig. A kontrasztozáshoz 1%-os tömény etanosos jóddoldatot használtunk, szobahőmérsékleten 24 órás inkubációs periódussal. A minták rehidratálásához leszálló alkohol sort használtunk 10-10 percig, majd desztillált vízben öblítettük őket. Ezt követően a jódozott mintákat a SkyScan 1272 kompakt asztali mikro-CT rendszerrel szkenneltük. A szkennelési paraméterek: 3,5 µm-es szeletvastagság, a 2688×4032 mátrix méret (sorok×oszlopok), a 70 kV-os forrásfeszültség, a 142 µA forrásáram, a 0,1 fokos elforgatási lépés és a Al szűrő (0,25 mm). A szkennelés időtartama 120 perc volt. A szkennelést követően a keresztmetszeti képeket a SkyScan NRecon szoftver (1.1.19-es verzió) segítségével rekonstruáltuk a tomográfiás képekből. Az adatok utófeldolgozása igazítást, sugárkeményítést és gyűrűs műtermék korrekciót tartalmazott. A képek kapott kimeneti formátumai .bmp és DICOM voltak. A tanulmányban használt 3D-s Volume rendering eszközt a DataViewer szoftver (verzió: 1.5.6.2.64 bites) biztosította. Koronális metszeteken megmértük a harmadik kamra leghosszabb latero-laterális átmérőjét a commissura posterior szintjében, valamint a hippocampális formáció rövid tengelyének átmérőjét annak legmagasabb pontján. Fontos megjegyezni, hogy az alkalmazott mikro-CT felbontása nem volt elegendő a hippocampus rétegeinek kimutatásához. Az agy teljes térfogatát a DataViewer szoftver (DataViewer Pty Ltd, Ausztrália) segítségével számítottuk ki.

III.9. Statisztikai értékelés

Az első kísérlet során a kontroll és az ultrahanggal kezelt állatok morфомetriai és qPCR adatait az OriginPro (OriginLab Corporation, Northampton, MA, Egyesült Államok) Mann–Whitney U-tesztje segítségével elemeztük összehasonlítás céljából.

A második kísérlet során a kontroll és az ultrahanggal kezelt állatok morфомetriai adatait statisztikai összehasonlításnak vetettük alá Mann–Whitney U-teszt vagy Two Sample T-teszt segítségével az OriginPro (OriginLab Corporation, Northampton, MA, Egyesült Államok) és a PAST szoftver (4.14-es verzió) segítségével (31). A kisszámú mintákon (csoportonként 3-3 állaton) végzett statisztikai összehasonlítás során Bonferroni-korrekción alkalmaztunk, a szignifikancia szintet $p \leq 0,05$ -ről $p \leq 0,017$ -re igazítva. A szignifikáns szinteket a boxplot diagramokon * ($p \leq 0,017$) vagy ** -val ($p \leq 0,01$) jelöltük. Ezenkívül a morфомetriai adatok összehasonlítására MANOVA analízist végeztünk PAST szoftverrel, az ábrák jelmagyarázatai végén részletezett eredményekkel, $p \leq 0,05$ szignifikancia szintet jelölve meg.

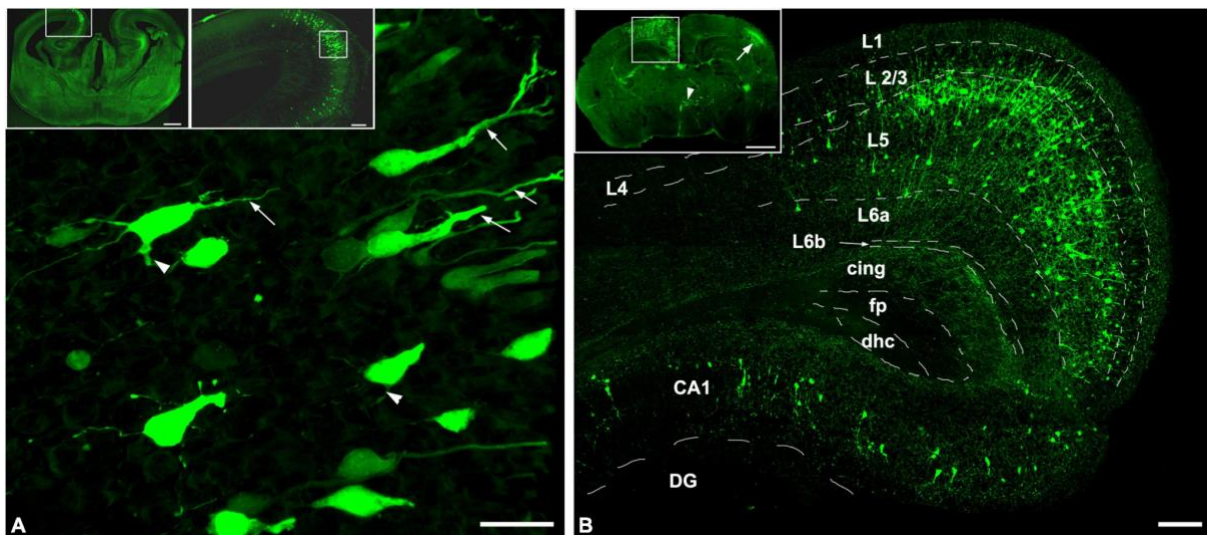
A boxplot diagramokon a négyzetek az adatok középső 50%-át jelentik a mediánnal, míg az oszlopok az adatok felső és alsó 25%-át jelölik. A kiugró adatokat csillaggal jelöltük, az átlagot kis középső négyzetek jelölik a nagy négyzeteken belül.

IV. EREDMÉNYEK

IV.1. A neuronok jelölődése az E14,5. napon történt *in utero* elektroporációt követően

Az agykéregben és a hippocampusban található piramis sejtek a periventricularis zónában található neuroprogenitor sejtekből származnak. Vizsgálatunk kezdeti szakaszában az E14,5-en történt méhen belüli elektroporációt követően a jelölt neuronok eloszlási mintázatára és a jelölődés minőségére fókuszáltunk az ultrahang stimuláció (E18,5) és a mintavétel idején (P3) (2. ábra).

2. ábra



2. ábra: *In utero* elektroporációt követően GFP-vel jelölt neuronok jelenlétét és eloszlási mintázatát mutattuk ki a frontális kéreg és a hippocampus területén.

Az egéragy koronális metszetein (A) E18,5 és (B) P3 korban ábrázolódnak az E14,5-en végzett jelölés eredményei. Az E18,5-en a GFP-vel jelölt neuronok a kéreg és a hippocampus megfelelő rétegeiben helyezkedtek el, amint azt a felső panelek (bekeretezett területek) ábrázolják. Ezek a jelölt neuronok polarizált morfológiát mutattak, jól látható apikális dendritekkel (nyilak), továbbá néhány esetben bazális dendritnek megfelelő nyúlványok is megfigyelhetők voltak (nyílhegyek) (A). A felső panelek bekeretezett területei a retrosplenialis cortex és a hippocampus CA1 régiójának nagyobb nagyításának helyét mutatják be. A retrosplenialis kéregben a GFP-pozitív piramis neuronok többsége az 5. rétegben helyezkedett el, valamint a jelölt hippocampális CA1 piramis sejtek is megfigyelhetők voltak. Az illusztráción a szaggatott vonalak a retrosplenialis kéreg rétegeinek a határait jelölik. Az

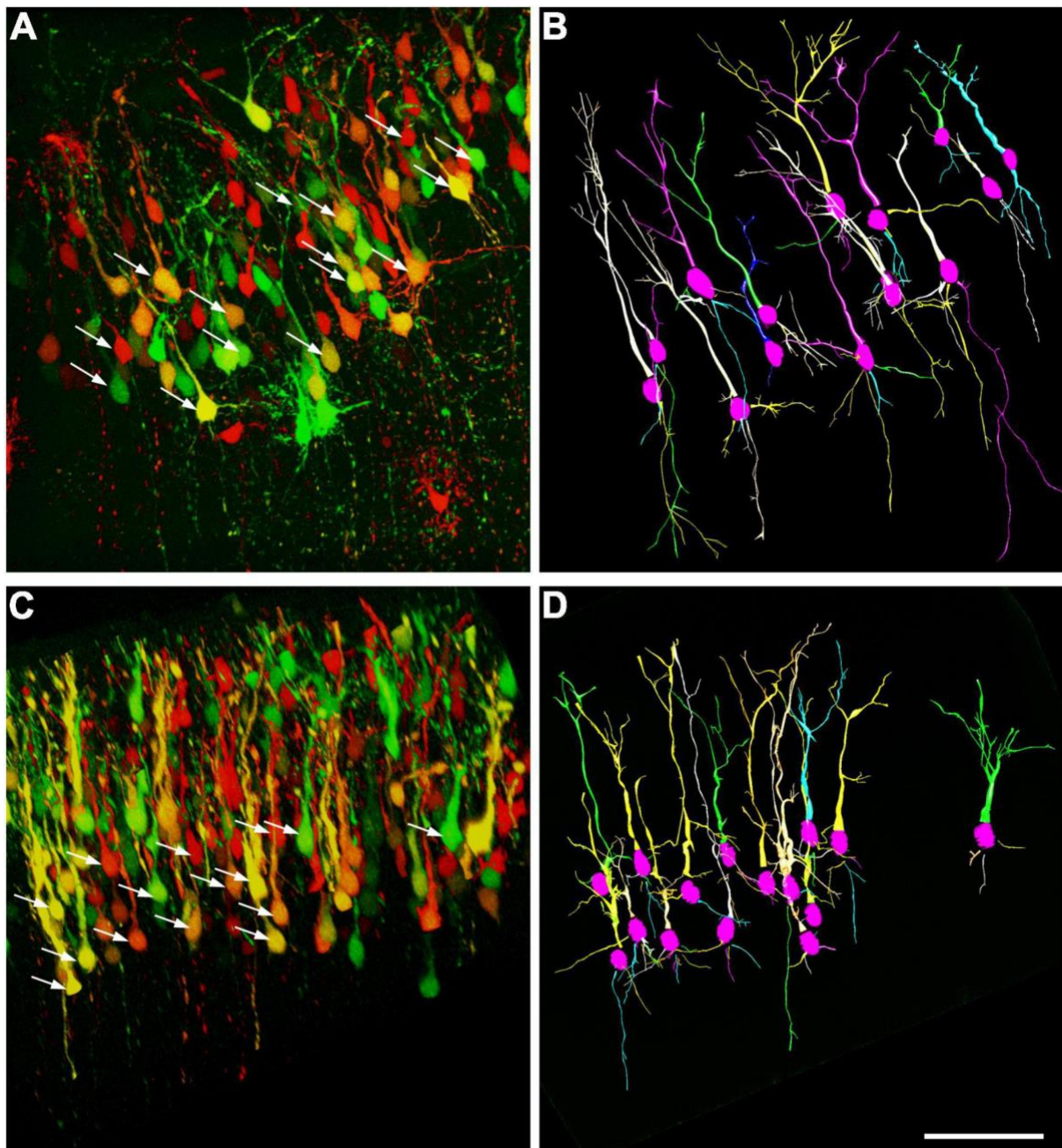
L1-L6b kérgi rétegekre utal; A cing a cingulumot jelöli; fp a corpus callosum forceps posteriori jelenti; a dhc a hippocampus commissura posteriori jelöli; A DG a gyrus dentatus; és CA1 a hippocampális CA1 régiót jelöli. A skála 20 μm az (A) képen, 500 μm a bal felső panelen, 100 μm a jobb felső panelen és 700 μm a (B) kép felső panelén.

Az elektroporációt követően négy nappal később (E18,5) a jelölt piramis sejtek a várt helyükre vándoroltak a retrosplenialis cortex 5. rétegében és a hippocampus CA1 régiójának piramis rétegében (**2A ábra, felső panelek**). A GFP-pozitív sejtek Hatanaka és mtsai. (32) megfigyelései szerint polarizált morfológiát mutattak, amelyre általában jellemző volt, hogy a migrációs vezető nyúlvány egy elágazó apikális dendritté alakult át (**2A ábra**). A GFP-vel jelölt neuronok egy részénél bazális dendrittek voltak azonosíthatóak, jelezve morfológiai differenciálódásuk stádiumát, míg másoknál nem, ami arra utal, hogy a legtöbb jelölt neuron morfológiai differenciálódása még folyamatban volt. A 3. posztnatális napon (P3) az injektált oldalon lévő frontális és retrosplenialis kéreg, valamint az ellenoldali szomatoszenzoros terület GFP-pozitivitást mutatott (**2B ábra**). Az injektált féltekén belül a GFP-vel jelölt kérgi neuronok többsége az 5. rétegben elhelyezkedő piramis sejt volt. Ennek megfelelően az ipszilaterális hippocampus a CA1 régió piramis rétegében elsősorban jelölt piramis sejtet tartalmazott. Bizonyos esetekben az injektált DNS az elektroporáció során az ellenoldali féltekébe és a harmadik kamrába disszeminált, ami az ellenoldali félteke és a diencephalon GFP-vel való jelölődését eredményezte. Ezekben az esetekben az ellenoldali szomatoszenzoros kéreg 4. rétegbeli interneuronjai és a hipotalamusz neuronjai túlnyomórészt a mediális és laterális ganglion eminenciák neurális progenitor sejtjeinek transzfekciója miatt jelölődtek. Fontos megjegyezni, hogy a GFP-vel jelölt neuronok az E14,5 után, szűk időkereten belül születtek, elérték végső feltételezett rétegbeli rendeltetési helyüket és P3-ra egy azonosítható kérgi réteget alakítottak ki. A kérgi rétegeken kívül megfigyelhető volt a piramis sejt morfológiája, amelyet két dendrit típus jellemezett, a hosszú és elágazó apikális dendrittek, amelyek az 1. rétegben végződtek, valamint a bazális dendrittek. Megemlítendő, hogy az 5. rétegbeli piramis sejt alosztályokba sorolása a fejlődésnek ebben a korai szakaszában nem volt megvalósítható.

IV.2. Az 5. rétegbeli piramissejtek bazális dendritjeinek száma nő ultrahanginger hatására

A piramissejtek hasonló jelölődési mintát mutattak, amikor GFP-t és amikor Brainbow vektort alkalmaztunk a jelöléshez (**3. ábra**). A jelölt 5. rétegbeli retrosplenialis piramissejtek nagy sűrűsége kihívást jelentett az egyes sejtek és dendritjeik rekonstrukciójában, amelyeket a Brainbow rendszerrel történő többszínű fluoreszcens képalkotás alkalmazásával sikerült kiküszöbölni. Az 5. rétegből kiválasztott, rekonstruált sejtek kétdimenziós ábrázolásai rendkívül hasonló morfológiai jellemzőket mutattak az apikális és a bazális dendritek elágazási mintázatát illetően. Eredményeink szerint egyetlen ultrahang stimulus összeségében nem okozott jelentős változásokat a piramissejtek morfológiájában (**3–5. ábra**), kivéve a dendritek számának növekedését (**4A ábra**). Az összes rekonstruált piramis neuronban egyetlen apikális dendrit volt jelen. Következésképpen az ultrahang stimulus alkalmazása a bazális dendritek számának 1-2-vel való növekedését eredményezte. A dendritfa elemzése azt mutatta, hogy az ultrahang kezelés nem gyakorolt szignifikáns hatást az elágazások számára (**4B, 4 ábra**). Ezenkívül a dendritek alakja is hasonló volt, mint a nem stimulált kontrollcsoportban (**4D ábra**). A Brainbow vektorral jelölt, a P3-on az 5. rétegben jelen lévő piramissejtek különböző színeket mutattak, amelyek különböző sejtvonalakat képviseltek, így összehasonlítható neuronpopulációt biztosítottak a statisztikai elemzéshez (**3A ábra**). Az idegsejtek arborizációja jól fejlett volt, amint az a 3D-ben rekonstruált neuronokon megfigyelhető (**3B ábra**). A prenatális ultrahang-expozíció neuronális morfológiára gyakorolt hatásának felmérése az 5. rétegbeli jelölt piramissejteket manuálisan rekonstruáltuk NeuroLucida szoftver segítségével. Az elemzés nem mutatott ki szignifikáns eltérést a kezelt és a kontroll piramis neuronok szegmentumainak átlagos kanyargósságában, átlagos szegmenshosszában, elágazásainak számában és dendrit hosszában, de szignifikáns volt a különbség a dendritszámot illetően, amely az ultrahanggal stimulált csoportban bizonyult nagyobbaknak.

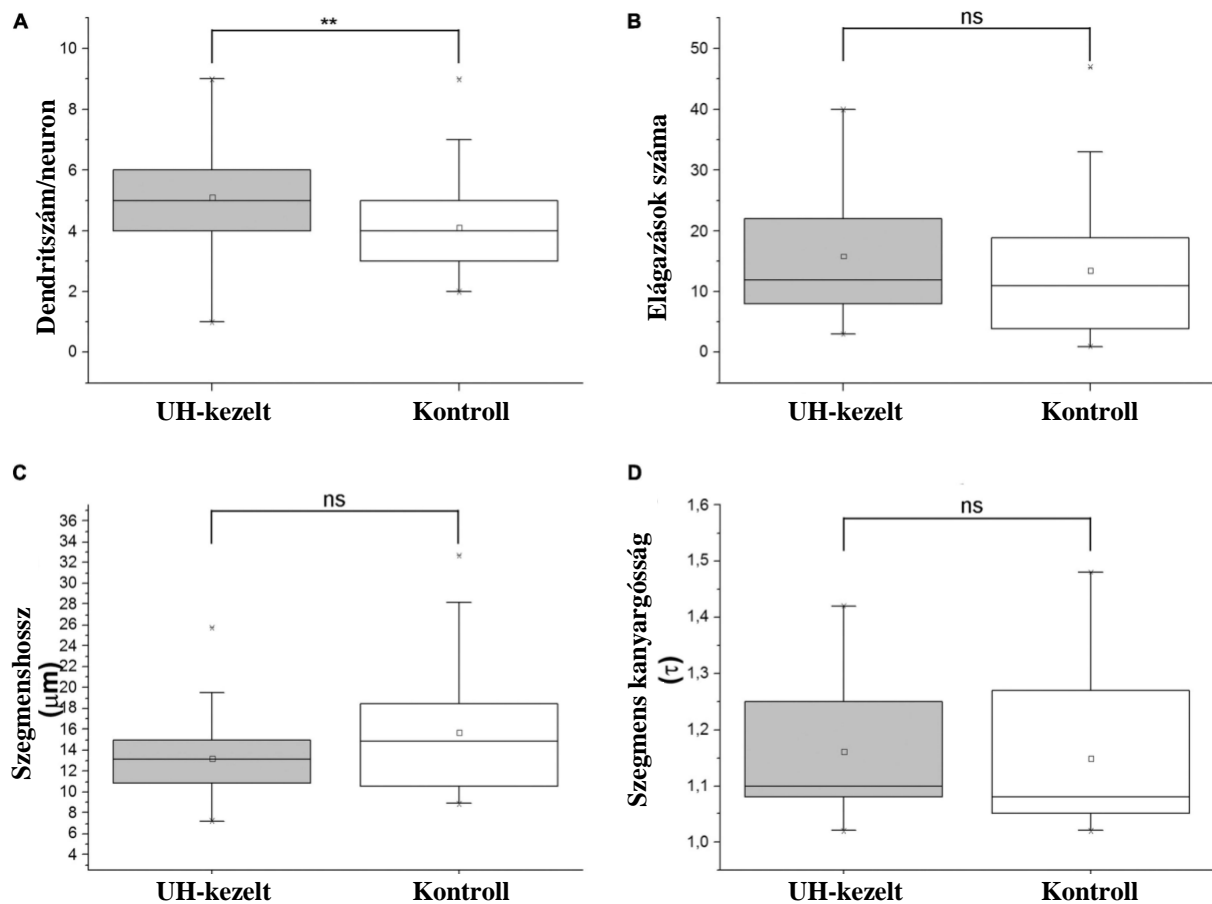
3. ábra



3. ábra: Piramis sejtek rekonstrukciója a retrosplenialis kéregben.

Brainbow vektorral jelölt neuronokat vizsgáltunk az E14,5-en történt *in utero* elektroporációt követően. A reprezentatív mintákat a születés utáni harmadik napon (P3) nyertük egy nem kezelt kontroll (A) és egy ultrahang kezelésnek alávetett állattól (C). Az 5. rétegből kiválasztott piramis neuronokat a Neurolucida szoftver segítségével rekonstruáltuk. A kontroll (B) és az ultrahanggal stimulált mintákból (D) rekonstruált piramis sejteket (15-15 piramis sejt) nyilakkal jelölve mutatjuk be. A skála 200 μm -t jelöl.

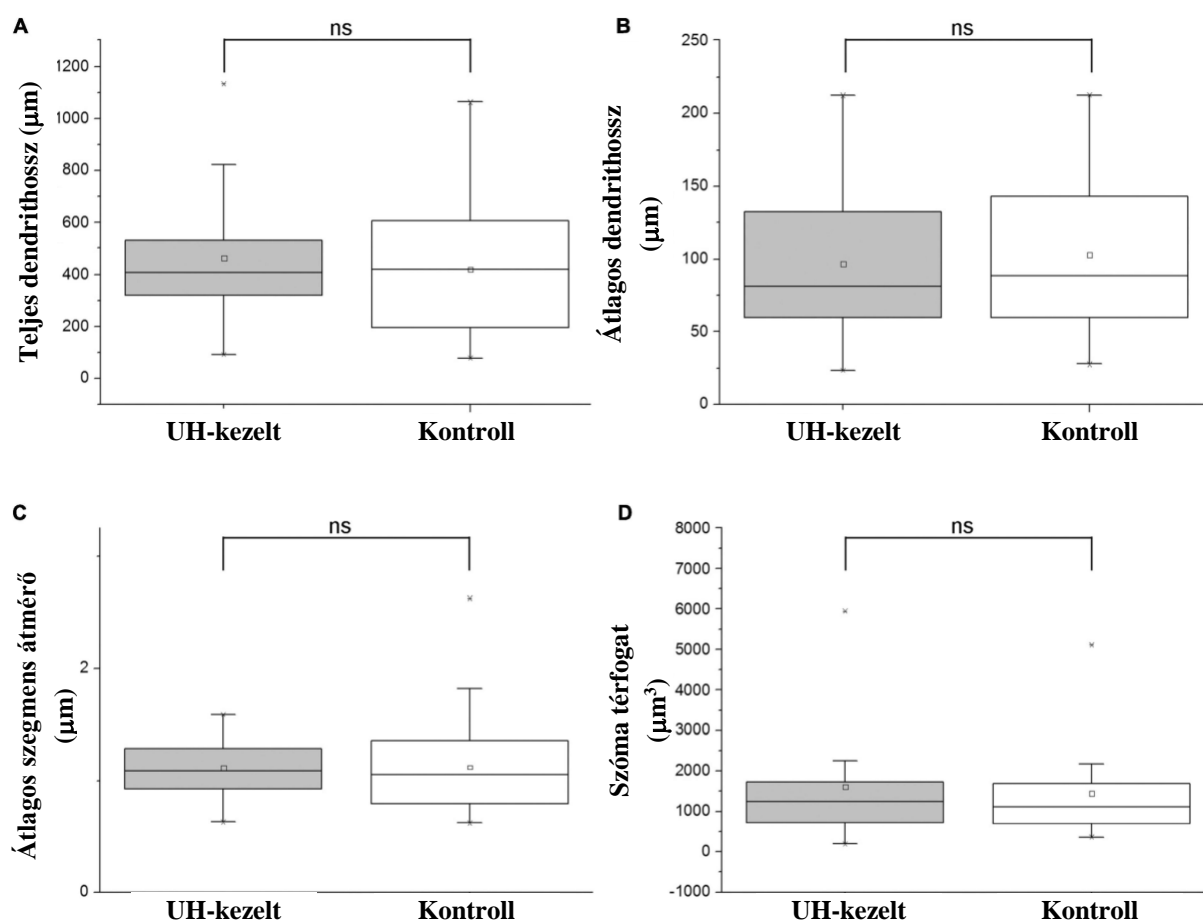
4. ábra



4. ábra: A dendritszám nő ultrahang kezelés hatására.

A P3 neuronok rekonstrukcióját követő morfometriai analízis kimutatta, hogy egy egyszeri, rövid távú intrauterin ultrahang inger 3 MHz frekvencián körülbelül 1-2-vel növelte a dendritek számát a nem stimulált kontrollcsoportéhoz képest (A). A dendritek morfológiája egyebekben nem mutatott szignifikáns változást az ultrahanggal kezelt és a kontrollcsoport között. Az elágazások számában (B) és az internodális dendrit szegmensek hosszában (C) csak enyhe, statisztikailag nem szignifikáns növekedés volt megfigyelhető, kanyargósságukat (D) az ultrahanginger nem változtatta meg. A statisztikai szignifikancia meghatározása: **p < 0,01, a nem szignifikáns eredményeket "ns"-ként jelöltük (mindkettőt Mann–Whitney módszerrel értékeltük).

5. ábra



5. ábra: A dendritek morfológiája és a szóma térfogata nem változik ultrahang stimulációt követően.

A 18,5. embrionális napon alkalmazott ultrahang kezelés nem okozott eltérést a dendritek hosszában (A, B), vastagságában (C) és a szóma méretében (D). Az ultrahanggal kezelt és a nem kezelt kontrollcsoportok összehasonlítása nem mutatott szignifikáns különbséget a fent említett paraméterek között.

IV.3. A neuronok gyorsan aktiválódnak már egyetlen ultrahang stimulust követően

A központi idegrendszerben a neuronális aktiváció a korai válasz gének expressziójának általános növekedésén keresztül is azonosítható, különös tekintettel a c-Fos-ra (33). Miller és mtsai. (34) kimutatták, hogy a c-Fos szintje frekvenciafüggő módon 2-3-szorosára nőtt ultrahang stimulus hatására. Ez a megállapítás ahhoz a hipotézishez vezetett, hogy a c-Fos magasabb relatív expressziója növelheti a downstream morfogenetikus molekulák, például a BDNF expresszióját (35). Feltételezik, hogy ez a növekedés elősegítheti

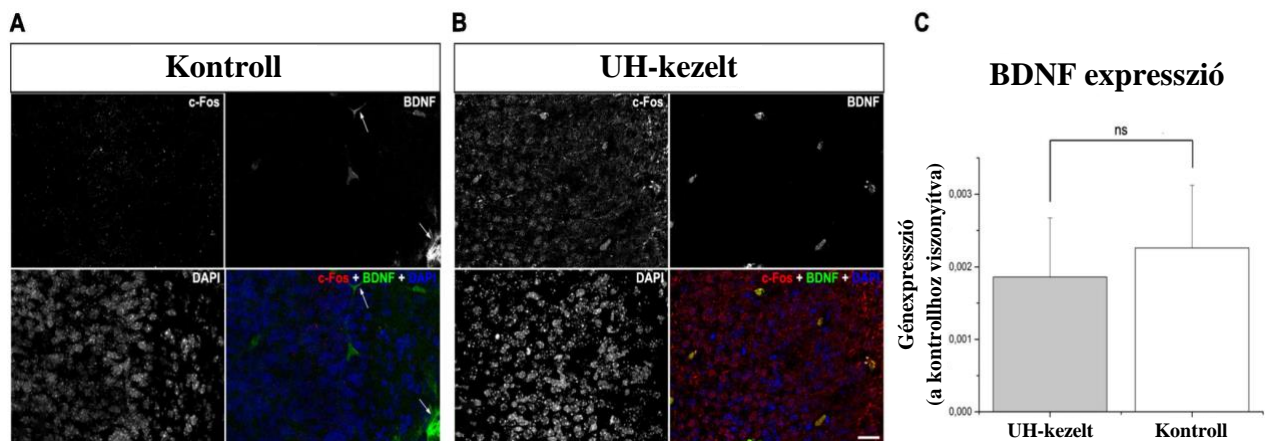
a dendritek növekedését a retrosplenialis kéreg érésben lévő neuronjain, hasonlóan a látókéregben megfigyelt folyamathoz, amint azt McAllister és munkatársai leírták (36).

Ezen hipotézis vizsgálata céljából elvégeztük a c-Fos expressziójának elemzését egyetlen, E18,5-en történt ultrahang stimulust követően (**6. ábra**). A nem stimulált kontroll minták nem mutattak immunfluoreszcens reakciót a c-Fos-ra (**6A ábra**), míg az immunreaktív jel jelentősen megnőtt az ultrahang stimulációt követően (**6B ábra**). Az átmeneti c-Fos emelkedés a stimulációt követő 30. napon visszaállt az alapszintre (**7G, 8H ábrák**), mely azonos szintű volt a kontroll egerekhez képest (**7C és 8G ábrák**). Az öt alkalommal ismételt stimuláció a c-Fos expresszió aktiválását eredményezte a kéreg szinte minden sejtjében (**7A, C, E, G, I, K, 7A–C, G–I ábrák**), ami nem korlátozódott csak a GFP-vel jelölt neuronokra (**8A–F, M–O ábrák**).

Az E18,5-en a BDNF immunreaktivitás túlnyomórészt az agyhártyára és az erekre lokalizálódott (**6A ábra**). Egyetlen ultrahang stimuláció - ellentétben a c-Fos-ra gyakorolt hatással - nem eredményezett változást a BDNF immunreaktivitásában a kéregben (**6A, B ábra**), és 60 perccel a stimuláció után nem volt szignifikáns különbség a BDNF mRNS szintjében (**6C ábra**). Ezzel szemben a több alkalommal ismételt ultrahang stimulus alkalmazása fokozott BDNF immunreaktivitást eredményezett a retrosplenialis kéregben (**7D, H, L, 8J–L ábrák**).

Az intrauterin ultrahang stimuláció hatással lehet az éretlen kortikális neuronok migrációs tulajdonságaira (11). Kísérletünk során azonban azt találtuk, hogy sem az egyszeri, sem az ismétlődő ultrahang stimuláció nem vezetett észrevehető változáshoz az 5. réteg piramissejtjeinek rétegbeli eloszlásában és alapvető morfológiájában (**7B, F, J ábrák**). Feltételezzük, hogy ennek a jelenségnek a hiányát az magyarázza, hogy az 5. rétegbeli neuronok migrációja befejeződött, mire az E18,5-en az első ultrahang stimulus megtörtént.

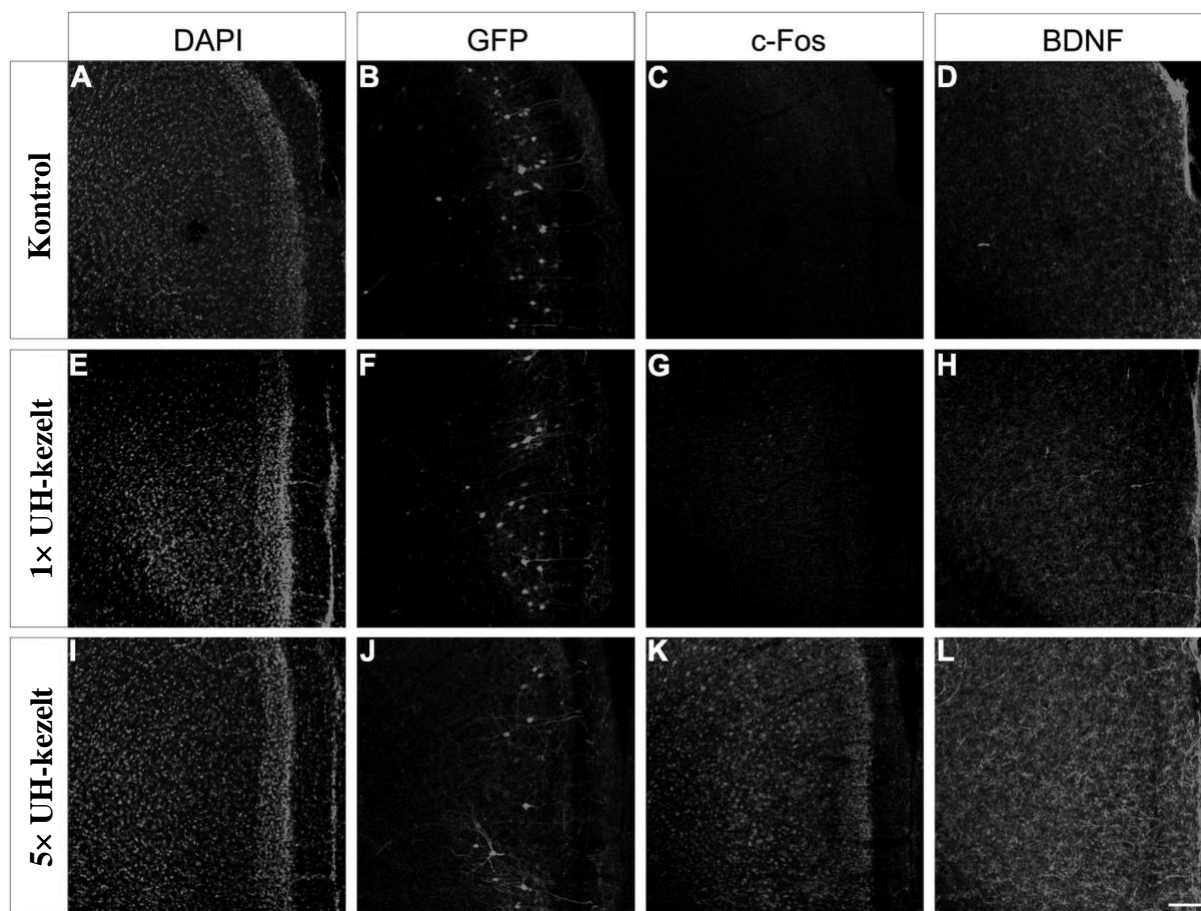
6. ábra



6. ábra: A neuronok aktiválódnak, de a BDNF expressziója nem nő egyetlen ultrahang inger hatására.

A konfokális szeletek a c-Fos (piros) és a BDNF (zöld) immunfluoreszcens jelölését mutatják be a retrosplenialis kéregben (**A**, **B**). A kezeletlen kontrollcsoport (**A**) alap c-Fos immunreaktivitást mutatott, míg egyetlen ultrahang inger (**B**) drámaian megnövelte annak expresszióját. A BDNF immunreaktivitás az erekre és az agyhártyára lokalizálódott (az (**A**) ábrán nyilak jelzik), és a teljes agy qPCR elemzése alapján a BDNF RNS expressziója sem változott (**C**). A skála 20 μm -t jelöl. A Mann–Whitney tesztet alkalmazó statisztikai analízis nem szignifikáns (“ns”) eredményt mutatott.

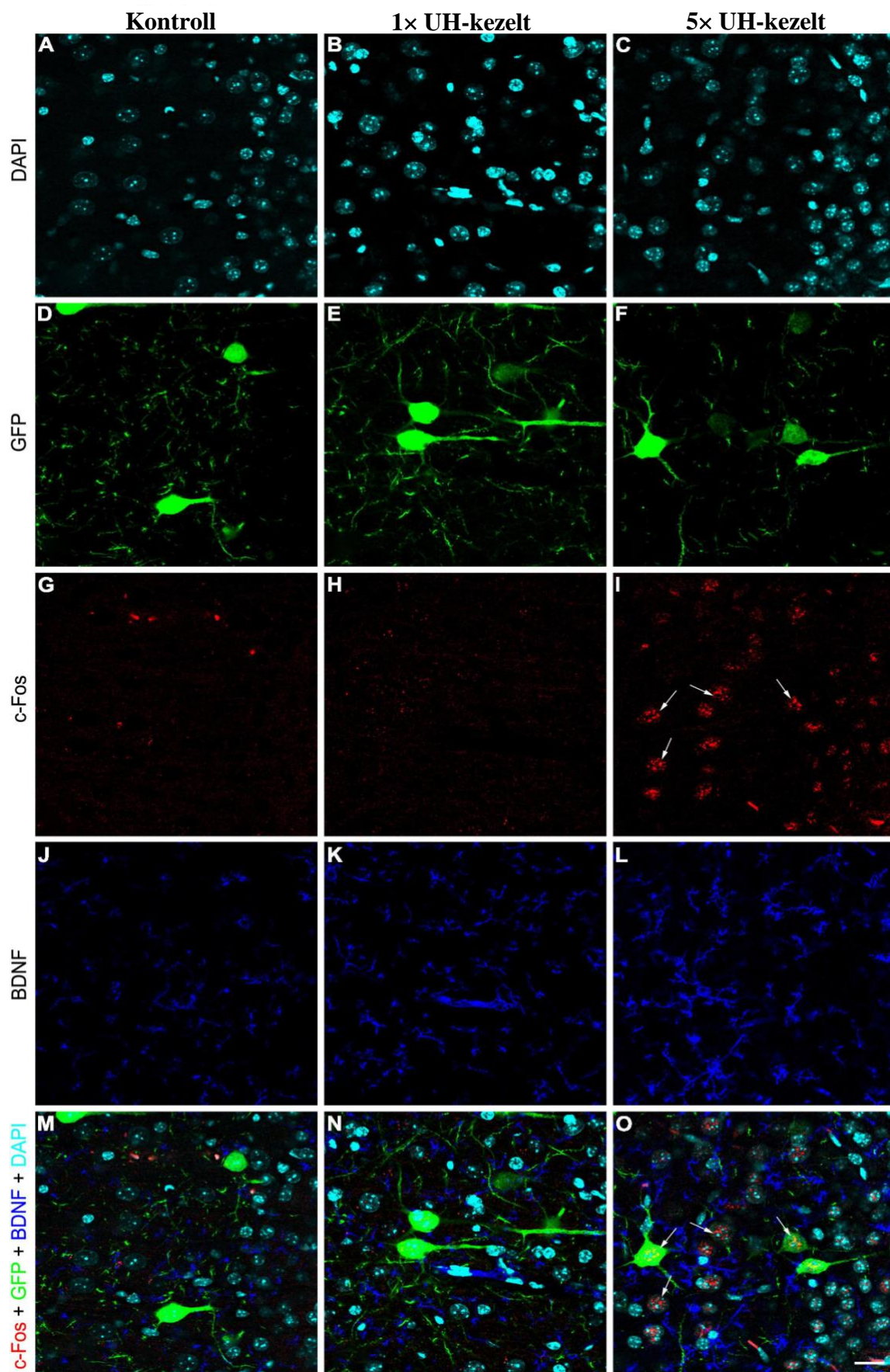
7. ábra



7. ábra: A c-Fos és a BDNF expressziója a kéregben megemelkedett ismételt ultrahang inger hatására.

Három csoportból gyűjtöttünk P30 egerek retrosplenialis kérgét ábrázoló konfokális képeket: nem kezelt kontroll (A–D), ultrahanggal E18,5. napon stimulált (E–H) és ultrahanggal ötször stimulált (I–L) csoportokból. Mindegyik metszet többszörös immunfluoreszcens jelölésen ment át, az immunhisztokémiai reakciókat különböző fluoreszcens színcsatornák segítségével szegregáltuk, és szürkeárnyalatban mutattuk be. A GFP jelölést az E14,5-en végeztük és a minták a retrosplenialis cortex érett piramissejtjeit mutatják be a nem stimulált kontrollcsoportból (B), az E18,5-en ultrahanggal stimulált (F), és az ismétlődő (hetente egyszer) ultrahanggal stimulált csoportból (J). A c-Fos (C, G) és BDNF (D, H) immunreaktivitás nem mutatott érdemi különbséget a kontroll és az egyetlen ultrahanggal stimulált csoport között, azonban a c-Fos és a BDNF immunpozitivitás észrevehető növekedését figyelték meg az ultrahanggal ötször stimulált csoportban (K, L) a nem stimulált kontroll mintához (C, D) képest. A metszeteket DAPI-val (A, E, I) háttérfestettük. A skála 100 μm -t jelöl.

8. ábra



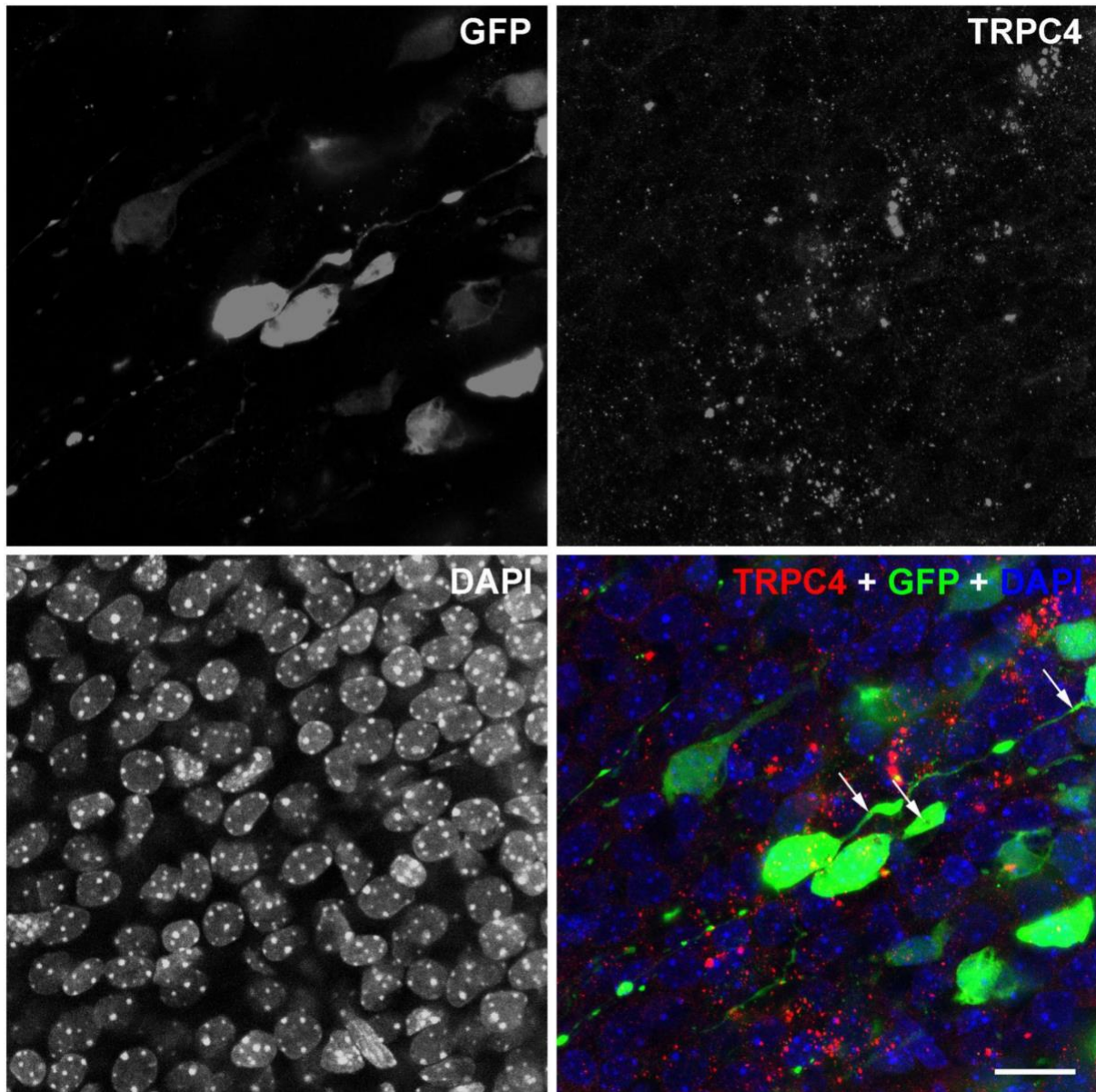
8. ábra: A c-Fos és a BDNF expressziója a frontális kéregben megemelkedik hetente ismételt ultrahang stimulus hatására.

A 0,5 μm vastag konfokális képeken a retrosplenialis kéreg részletes nézete látható, kiemelve az 5. réteg GFP-vel jelölt piramis neuronjait (**D–F**), c-Fos-t (**G–I**) és BDNF-et (**J–L**) immunhisztokémiával és DAPI-festéssel (**A–C**) különböző fluoreszcens színcsatornákon, valamint együtt megjelenítve (**M–O**). A nem stimulált kontroll és az egyszeri ultrahanggal stimulált minták alacsony BDNF és c-Fos immunpozitivitást mutattak (**J, K, G, H**). Az ultrahanggal ötször stimulált csoportban azonban észrevehető c-Fos immunreaktivitás (**I**, nyilak) a GFP-vel jelölt neuronokban és más sejtekben (**O**), valamint megnövekedett BDNF immunreaktivitás (**L**). A skála 20 μm -t jelöl.

IV.4. A GFP-vel jelölt piramis neuronok kifejezik a TRPC4 csatornát

A diagnosztikai ultrahang frekvenciatartománya és MI-je a sejtmembrán kavitációjához szükséges küszöb alatt van, ami esetlegesen közvetlenül megemelhetné a sejtekben a c-Fos szintet (37). Hipotézisünk az volt, hogy az ultrahang stimulációt követően megnövekedett c-Fos szintért receptor által közvetített jelátvitel lehetett felelős. Annak érdekében, hogy jobban megértsük az ultrahang-inger függő c-Fos aktiváció mögött meghúzódó lehetséges jelátviteli mechanizmusokat, fókuszunk az E18,5-en mechanoszenzitív receptorok vizsgálatára irányult. Eredményeink E18,5-en a TRPC4 pontszerű eloszlását mutatták ki a retrosplenialis kéreg GFP-vel jelölt piramissejtjeiben (**9. ábra**). Emellett TRPC4-immunpozitív szignálokat figyeltünk meg a GFP-vel jelölt piramissejtek nyúlványiban is, ahol az endoplazmatikus retikulum jelenléte kétséges volt. Tekintettel a TRPC4 pozitívására a GFP-vel jelölt neuronokban, valószínű, hogy az ultrahang stimulus a citoplazmatikus Ca^{2+} koncentráció növekedéséhez vezethetett ezekben az idegsejtekben.

9. ábra



9. ábra: A GFP-vel jelölt piramissejtek TRPC4-et expresszálnak.

Az E18,5 a frontális kérgről készült konfokális képeken GFP-vel (zöld) (E14,5) jelölt éretlen neuronokat ábrázolnak különálló és egyesített fluoreszcens színcsatornákon. DAPI-t (kék) használtunk a sejtek magjainak jelölésére. A TRPC4 (piros) immunfestése jellegzetes pontszerű mintázatot mutatott ki a citoplazmában és esetenként a GFP-vel jelölt neuronok nyúlványaiban, amint azt a nyilak jelzik. A skála 20 μm -t jelöl.

IV.5. A CA1 neuronok morfológiai jellemzői megváltoznak ismételt ultrahang expozíció hatására

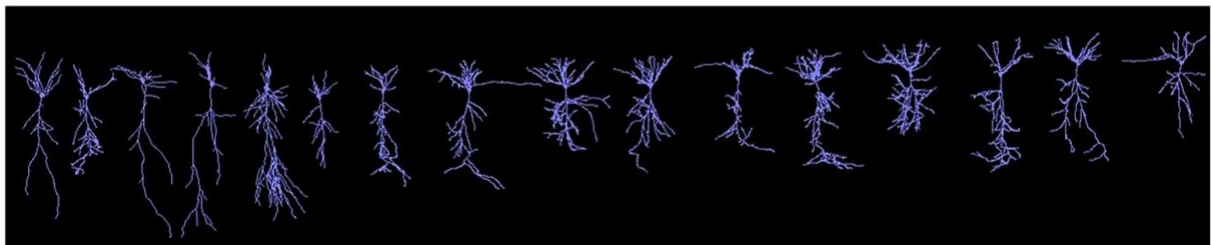
A morfometriai analízis alapján azt tapasztaltuk, hogy a dendritek átlagos hossza konzisztens maradt (**10. ábra**). A bazális dendritek esetében a dendritek átlagos szegmenshossza és a dendrithossz szignifikáns növekedést ($p \leq 0,01$) mutatott az ultrahang kezelés hatására (**11. ábra**). Ezzel szemben az apikális dendritfa tulajdonságai nem mutattak jelentős változást (**12. ábra**). Összegezve, a MANOVA teszttel szignifikáns különbségeket állapítottunk meg a két csoport között a vizsgált dendritfák tulajdonságaiban; $p: 0,004$.

10. ábra

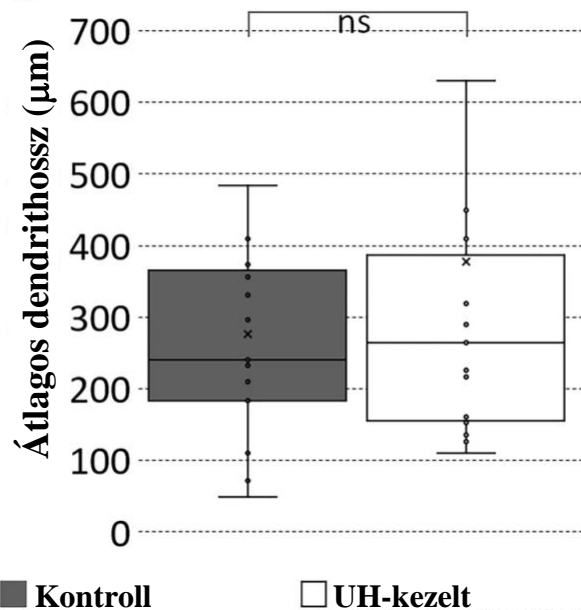
A



B



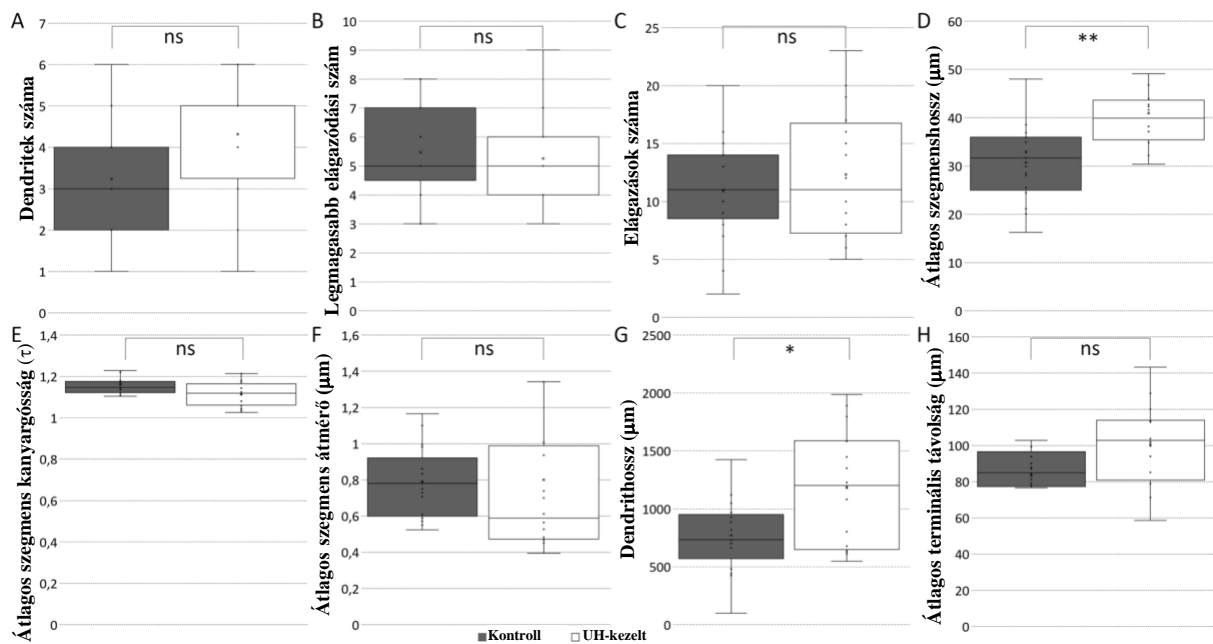
C



10. ábra: A CA1 serkentő neuronok dendritjeinek átlagos hossza nem változik meg ultrahang kezelés hatására.

Az **A** és **B** panelek a kontroll és ultrahanggal kezelt CA1 serkentő neuronok rekonstrukcióit jelenítik meg. Az átlagos dendrithosszt a **C** panelen számszerűsítettük, $p=0,9$ a kontroll ($276,44\pm 38,78$) és az ultrahanggal kezelt ($376,7\pm 112,53$) neuronok esetében. Az átlagos hossz tekintetében nem volt szignifikáns különbség a két csoport között. A skála $400\ \mu\text{m}$ -t jelöl.

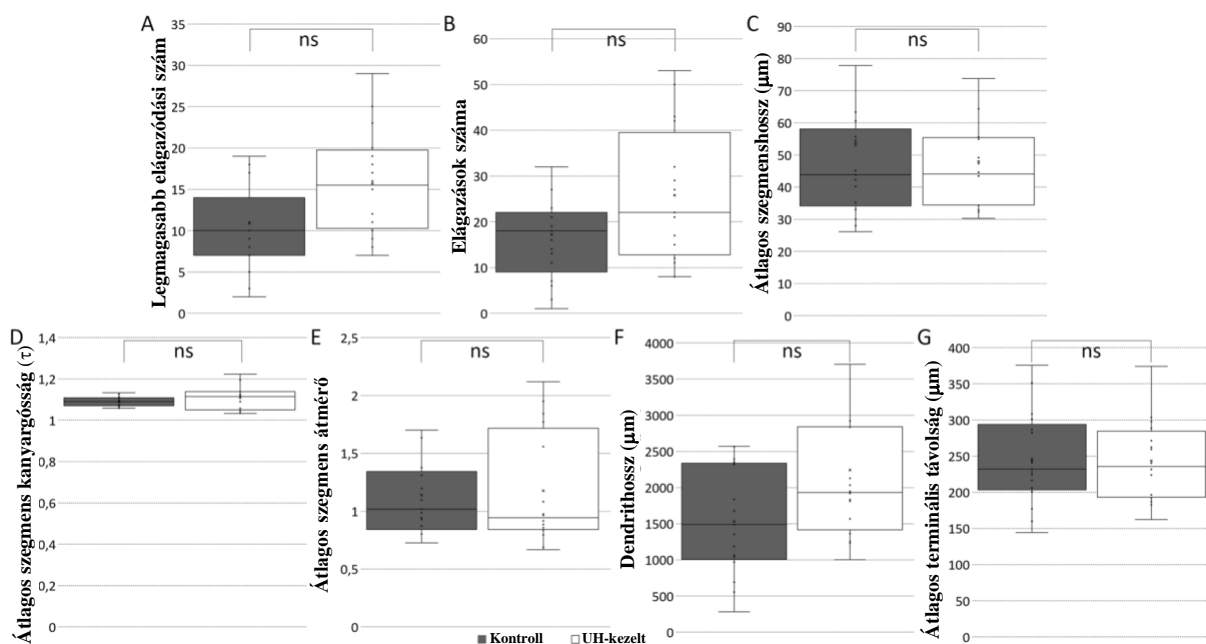
11. ábra



11. ábra: A CA1 serkentő neuronok bazális dendritfájának több morfológiai tulajdonsága megváltozik ultrahang kezelés hatására.

A bazális dendritfa jellemzőinek összehasonlítása során a kontroll és az ultrahanggal kezelt csoportok között a következő megfigyeléseket végeztük: dendritek száma (**A** panel, $p=0,0323$, kontroll $3,24\pm 0,32$, ultrahanggal kezelt $4,31\pm 0,26$), legmagasabb elágazódási szám (**B** panel, $p=0,6739$, kontroll $5,47\pm 0,37$, ultrahanggal kezelt $5,25\pm 0,36$), elágazások száma (**C** panel, $p=0,4233$, kontroll $10,88\pm 1,08$, ultrahanggal kezelt $12,31\pm 1,39$), átlagos szegmenshossz (**D** panel, $p=0,0011$, kontroll $30,66\pm 1,89$, ultrahanggal kezelt $40,93\pm 2,21$), átlagos szegmens kanyargósság (**E** panel, $p=0,051$, kontroll $1,16\pm 0,02$, ultrahanggal kezelt $1,11\pm 0,02$), átlagos szegmens átmérő (**F** panel, $p=0,2009$, kontroll $0,78\pm 0,05$, ultrahanggal kezelt $0,80\pm 0,12$), dendrit hossz (**G** panel, $p=0,008$, kontroll $771,3\pm 74,70$, ultrahang $1188,82\pm 124,07$), átlagos terminális távolság (**H** panel, $p=0,0491$, kontroll $83,19\pm 6,40$, ultrahanggal kezelt $100,53\pm 5,53$). A szignifikáns különbségeket a következőkkel jelöltük: ** ($p \leq 0,01$); * ($p \leq 0,017$). A MANOVA teszt szignifikáns különbséget mutatott ki $0,0009$ p-értékkel.

12. ábra



12. ábra A CA1 serkentő neuronok apikális dendritfája nem változik meg ultrahang kezelés hatására.

Az alábbi adatok az apikális dendritfa jellemzőinek számszerűsítését mutatják be, összehasonlítva a kontrollcsoportot egy ultrahanggal kezelt csoporttal. Az alábbi paraméterek kerültek összehasonlításra: dendritek száma (nem ábráztuk boxploton, kontroll 1, ultrahanggal kezelt 1), legmagasabb elágazódási szám (A panel, $p=0,03768$, kontroll $10,88\pm 1,53$, ultrahanggal kezelt $15,69\pm 1,60$), elágazások száma (B panel, $p=0,0701$, kontroll $17,24\pm 2,65$, ultrahanggal kezelt $25,75\pm 3,66$), átlagos szegmenshossz (C panel, $p=1$, kontroll $53,72\pm 8,84$, ultrahanggal kezelt $47,97\pm 4,27$), átlagos szegmens kanyargósság (D panel, $p=0,2478$, kontroll $1,09\pm 0,01$, ultrahanggal kezelt $1,11\pm 0,01$), átlagos szegmens átmérő (E panel, $p=0,7594$, kontroll $1,14\pm 0,09$, ultrahanggal kezelt $1,18\pm 0,12$), dendrithossz (F panel, $p=0,05396$, kontroll $1530,48\pm 176,52$, ultrahanggal kezelt $2240,96\pm 283,30$) átlagos terminális távolság (G panel, $p=0,9209$, kontroll $245,62\pm 15,55$, ultrahanggal kezelt $243,53\pm 13,87$). A szignifikáns különbségek *-gal vannak jelölve ($p \leq 0,017$). A MANOVA teszt nem mutatott szignifikáns különbséget ($p:0,3523$).

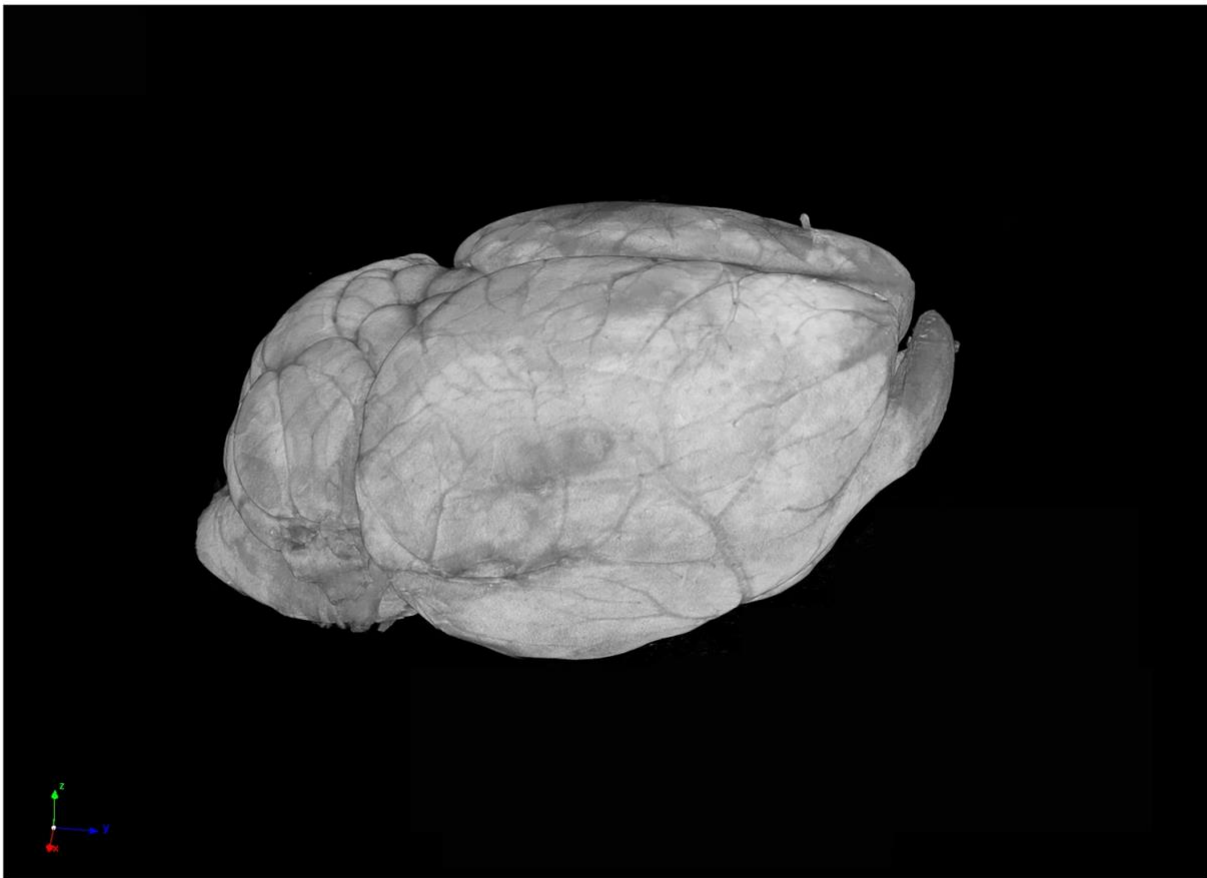
IV.6. A hippocampális régió morfológiai elemzése mikro-CT-vel

Egyéves egerek agyát mikro-CT vizsgálatnak vetettük alá, hogy megmérjük a teljes agy térfogatát és a hippocampus átmérőjét. Koronális agymetszeteken a commissura posterior (mint támpontként szolgáló azonosítható anatómiai képlet) szintjében mértük a III. kamra legnagyobb vízszintes átmérőjét és a hippocampális formáció rövid tengelyének átmérőjét,

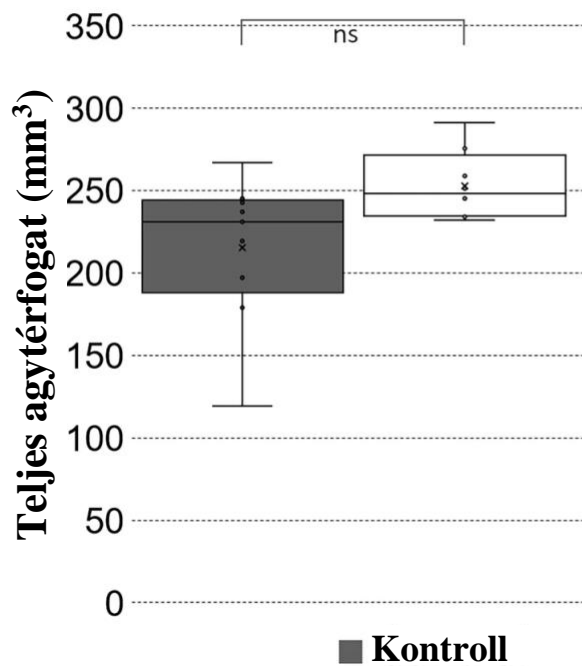
ezeket a méréseket három szakértő vizsgálta egymástól függetlenül. Az agy teljes térfogatára és tömegére magas ($p \leq 0,01$ -es) szignifikancia szintet alkalmaztunk az esetleges, a bazális felszínen a disszekcióval összefüggő sérülések miatt, míg az összes többi mérésnél $p \leq 0,017$ -es szignifikancia szintet alkalmaztunk. A vizsgálat jelentős különbséget mutatott ki a hippocampális formáció vastagságában a kontroll és az ultrahanggal kezelt csoportok között, amely nagyobb volt az ultrahanggal kezelt csoportban (**13. és 14. ábra**).

13. ábra

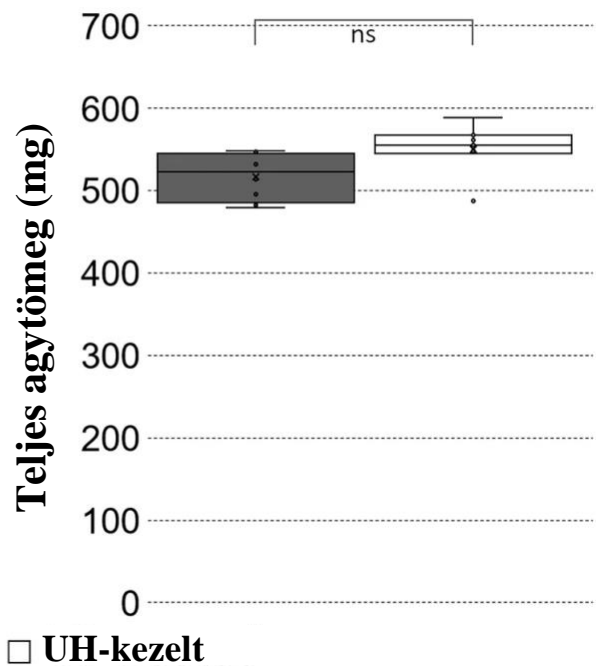
A



B



C

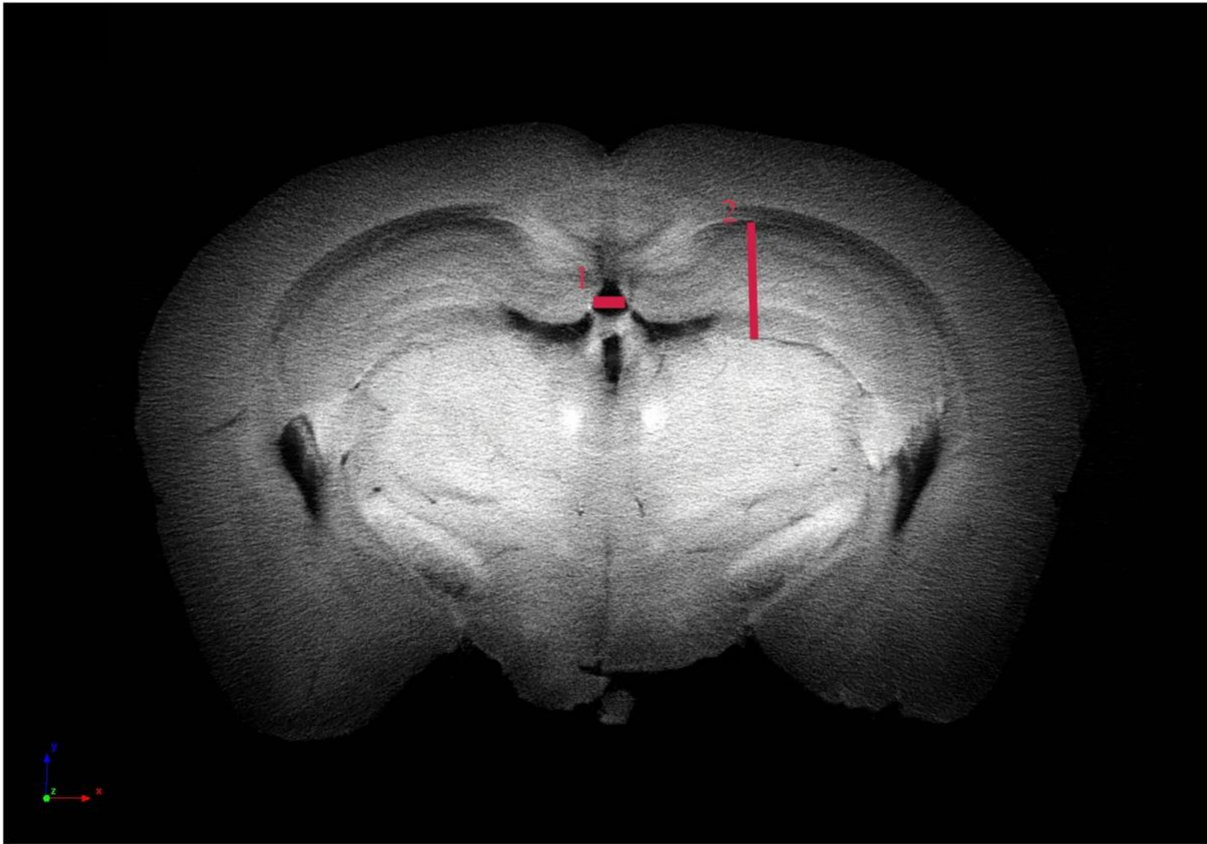


13. ábra: A teljes agytérfogat és az agy össztömege nem változik meg ötször ismételt ultrahang expozíció hatására.

Egyéves egér agyának reprezentatív, 3D térfogat-renderelt rekonstrukciója az **A** panelen látható. A teljes agytérfogat mennyiségi meghatározását a **B** panel szemlélteti ($p=0,06$, kontroll $215\pm 14,8997$, ultrahanggal kezelt $253\pm 7,5106$), a teljes agytömeg a **C** panelen ábrázolódik ($p=0,04$, kontroll: $517\pm 10,0125$, ultrahanggal kezelt $550\pm 11,8290$). Megfigyelésünk alapján nem volt szignifikáns különbség a teljes agytérfogatban és a teljes agytömegben a kontroll és az ultrahanggal kezelt csoportok között ($p \leq 0,01$). A MANOVA teszt nem szignifikáns eredményt mutatott, p -érték: $0,09$.

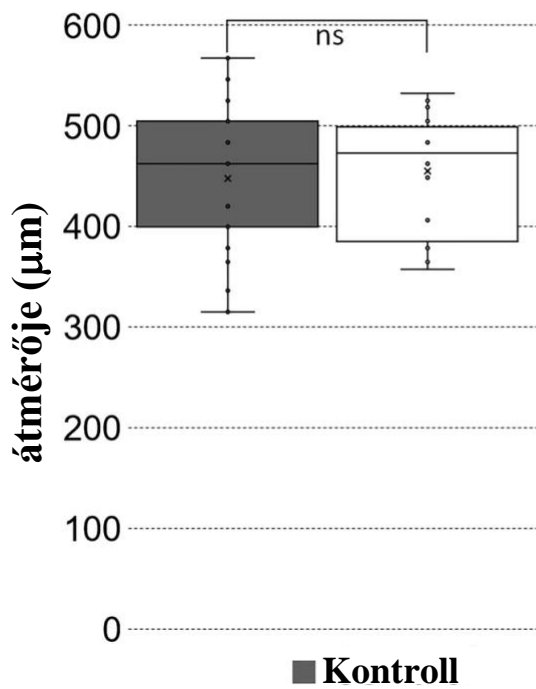
14. ábra

A



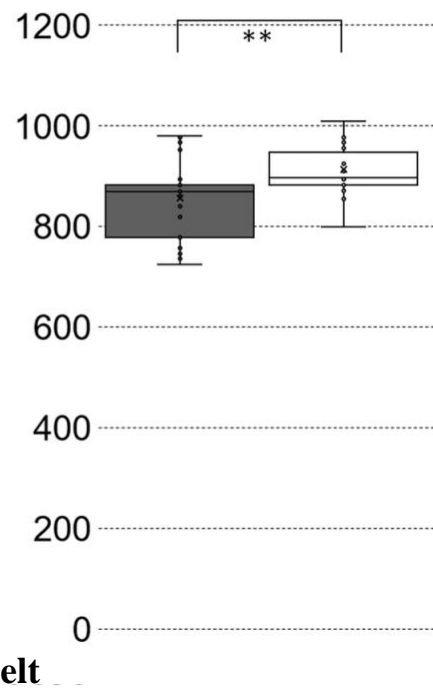
B

A III. kamra legnagyobb
átmérője (μm)



C

A hippocampális formáció
vastagsága (μm)



14. ábra: Az ismételt ultrahang stimuláció védő hatással bír a hippocampális atrófiával szemben.

A következő méréseket végeztük: a III. kamra legnagyobb vízszintes átmérője (μm -ben) (mérés lokalizációja: 1. piros vonal az **A** panelen, számadatokkal a **B** panelen, $p=0,84$, kontroll $449\pm 24,8980$, ultrahanggal kezelt $456\pm 21,8350$), és a hippocampális formáció vastagsága (μm -ben) (mérés lokalizációja: 2. piros vonal az **A** panelen, számadatokkal a **C** panelen: $p=0,01$, kontroll $861\pm 27,5193$, ultrahanggal kezelt $912\pm 13,1125$). A szignifikánsan eltérő értékeket ******-gal jelöltük ($p \leq 0,01$). A MANOVA teszt szignifikáns különbséget mutatott $p=0,017$ értékkel.

V. MEGBESZÉLÉS

Eredményeink azt mutatják, hogy már egyetlen rövid ideig tartó diagnosztikai ultrahang stimulus csekély, de tartós hatással van az idegsejtek morfológiájára. Ezt a hatást a retrosplenialis kéreg (amely a limbikus rendszer egyik kulcsterülete) 5. rétegének piramissejtjein a bazális dendritek számának növekedése jellemezte. A limbikus terület döntő szerepet játszik különböző funkciókban, mint például a tanulásban és a rágcsálók térbeli navigációjában (38).

Fontos megjegyezni, hogy az ultrahang morfológiai változásokat indukált nemcsak a neocortex 5. rétegében, hanem a CA1 régió piramissejtjein is. A CA1 régióban a bazális dendritek és szegmenseik hosszának növekedését figyeltük meg. Ezenkívül azt tapasztaltuk, hogy ismételt ultrahang expozíciót követően az egyéves egerek hippocampális formációja nagyobb vastagságot mutatott a kontrollcsoportéhoz képest. Ez arra a következtetésre vezetett, hogy az ismételt ultrahang hosszú távon befolyásolja a központi idegrendszer morfológiáját.

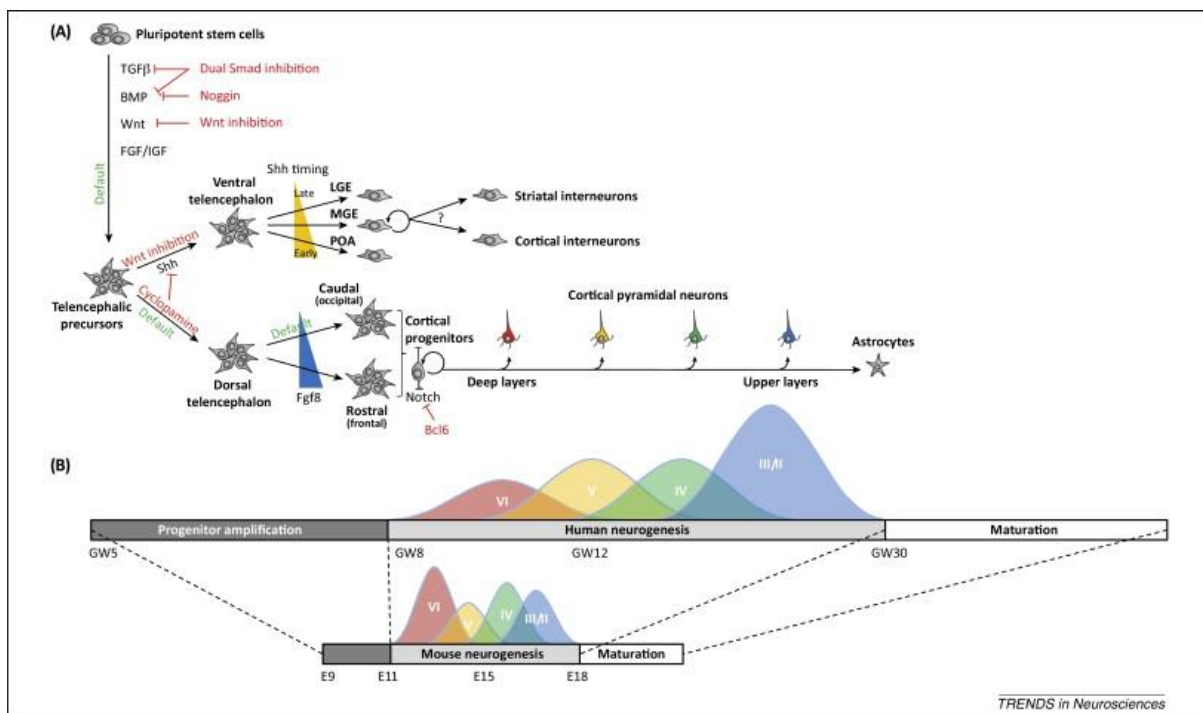
Kiemelendő, hogy az ismétlődő ultrahang a c-Fos korai válaszgén és egy morfogenetikus molekula, a BDNF fokozott expresszióját váltotta ki, azaz nem csupán morfológiai, hanem biokémiai változásokhoz is vezetett az idegsejtekben.

V.1. Neuronális differenciálódás ultrahang expozíció után

Az egér embrionális kéreg fejlődésének 14. napja megfelel az emberi agykérgi fejlődés 12. hetének, pontosabban az 5. rétegbeli neuronok születésének. Kutatások szerint az egereknél az E18,5-en történt ultrahangexpozíció hasonló hatással van az idegrendszer neuronjaira, mint az ultrahang expozíció emberi terhességben a 30. héten (**15. ábra**; 39). Egy korábbi tanulmány kimutatta, hogy a pre- és perinatális ultrahangnak való kitettség befolyásolja az agy fejlődésének különböző aspektusait, különösen a neuronok migrációjával kapcsolatban (11). Egy 30 perces, 6,7 MHz-es ultrahang stimuláció hatásait vizsgáló kutatás során azt figyelték meg, hogy a neocortex neuronjainak migrációja jelentősen lelassult, továbbá bizonyos piramissejtek nem megfelelő rétegekbe érkeztek meg, egyesek akár a fehérállományban megrekedtek (11). Tekintettel arra, hogy kutatásunk során az ultrahang stimulációt az E18,5 korban alkalmaztuk, amikor az 5. réteg neuronjai már elérték céljukat, az ultrahang fejlődő limbikus területek neuronjainak migrációjára gyakorolt potenciális hatásának vizsgálata kísérleti körülményeink keretein belül nem volt megvalósítható. Mindazonáltal nem lehet kizárni a vizsgálatok során alkalmazott 3 MHz frekvenciájú ultrahang expozíció

neuronális és gliasejtek migrációjára gyakorolt hatását. A migráló piramis neuronok polaritást mutatnak, a migráció során jelenlévő vezető nyúlvány később apikális dendritté alakul át, míg az axon a hátsó nyúlványból alakul ki (33, 40, 41). Kutatási eredményeink azt mutatják, hogy az ultrahang expozíció növelte a bazális dendritek számát a retrosplenialis kéreg 5. rétegének piramissejtjein. Megfigyeltük, hogy ezek a dendritek újonnan képződtek, nem pedig a már meglévő migrációs nyúlványok differenciálódásából származtak. Ez annak tulajdonítható, hogy a dendritfa fejlődése rendkívül összehangolt módon történik, magába foglalva olyan dinamikus folyamatokat, amelyek szükségessé teszik a citoszkeleton átrendeződését. Ez az újonnan kialakult nyúlványok folyamatos növekedését és visszahúzódását eredményezi, reagálva az elektromos, mikrokörnyezeti vagy belső jelekre (42).

15. ábra



15. ábra: A humán és egér kortikogenezis összehasonlítása.

Forrás: van den Ameele et al., 2014

V.2. A mechanoszenzitívitas hatása a neuronális nyúlványok növekedésére

Azok a specifikus mechanizmusok, amelyek révén az ultrahang befolyásolja a neuronális nyúlványok növekedését az idegsejtek polarizációja és differenciálódása során, még részben tisztázatlanok. *In vitro* vizsgálatok kimutatták, hogy a mechanikai stimuláció (tenzió) elősegíti az idegi progenitor sejtek differenciálódását és növeli a dendritfa komplexitását (11,

43). Kísérleteink alapján valószínűsíthető, hogy a dendritek megnövekedett száma a növekvő nyúlványok ultrahang inger hatására bekövetkező destabilizációjával magyarázható, amely citoszkeletális átrendeződéshez vezetett. *In vitro* tenyésztett patkány agyszeletekben ultrahanggal (0,5 MHz, 10 percig) végzett kezelés után azt találták, hogy a citoszkeleton gyors átrendeződése a hippocampalis CA1 neuronokon a neuritok hosszának csökkenéséhez vezetett. Ezzel szemben az ultrahang stabilizálta azon dendritek és axonok növekedését, amelyek már kialakítottak szinaptikus érintkezést (7, 43, 44). A mechanikai feszülés sejtszinten molekuláris jelátvitelt indíthat el. Különböző mechanoszenzitív csatornák, mint például a Piezo1, TRPA1, TRPC4, TRPV4, MEC-4, a kétpórusú domén káliumcsatornák (K2Ps), valamint a feszültségfüggő Na⁺ és Ca²⁺ csatornák korábbi tanulmányok szerint reagáltak az ultrahangra (45-51). A pontos mechanizmus, amellyel ezen ioncsatornák ultrahang által közvetített aktiválása befolyásolja a dendrit növekedést, nem teljesen ismert. Ismeretes azonban, hogy az ultrahanggal való stimuláció elősegíti a dendritfa növekedését a MAPK vagy ERK1/2 útvonalak aktiválása révén, ami mechanoszenzitív ioncsatornák, például a TRPV4 és a Piezo1 által közvetített megnövekedett intracelluláris Ca²⁺ szintnek tulajdonítható (50). Az embrionális egérágyban ezen csatornák többsége - a TRPC4 kivételével - alacsony expressziós szintet mutat. A TRPC4 expressziója döntően a subpallialis régiókban az E13,5-en kezdődik, és az E18,5-re fokozatosan kiterjed a kéregre, beleértve a limbikus területet is, és a kortikális neuronok általi expressziója a felnőtt élet során is folytatódik (9. ábra; 22, 52). Tekintettel arra, hogy kísérletünkben az ultrahang expozíció alkalmazása a 18,5. embrionális napon vagy későbbi időpontban volt, nagy a valószínűsége annak, hogy ez az inger a TRPC4 csatornák aktiválásához vezetett. Ezek a mechanoszenzitív ioncsatornák kulcsfontosságúak az ultrahang stimuláció mechanizmusában és részt vesznek a neuritok növekedésének szabályozásában, valószínűleg azáltal, hogy fokozzák az endoplazmatikus retikulumból történő Ca²⁺ kiáramlást (25), valamint aktiválják a CaM kináz és a CREB által közvetített útvonalakat (26). A TRPC4 csatornával nem rendelkező állatokban az ultrahang stimulációval szembeni válaszreakció jelentős csökkenést mutatott, a károsodott TRPC4-funkciójú állatok pedig szintén csökkent választ mutattak az ultrahang stimuláció során (24, 25).

V.3. Az ultrahang stimulus aktiválja a korai válasz géneket és a neurotrofinok felszabadulását

A neuronális mechanoszenzitív receptorok és ioncsatornák ultrahang expozíció általi aktiválása jelátviteli kaszkádot indíthat el, amely a c-jun és a c-Fos fokozott expresszióját

eredményezi. Kísérletünk során (**6. ábra**) egyetlen 3 MHz-es, 10 perces ultrahang expozíció megnövelte a c-Fos immunreaktivitást az egér magzat agyában egy órával a stimulust követően. A c-Fos gyors és átmeneti expressziója a neuronális hálózat működésének számos aspektusát szabályozza, beleértve a tanulást és a memóriát (53, 54, 55).

Egy korábbi tanulmány szerint a patkány retrosplenialis kéregben a BDNF felszabadulás következtében létrejövő a c-Fos aktiválódás elengedhetetlen a félelem által motivált hosszú távú memória létrejöttéhez. Fontos megjegyezni, hogy a BDNF ún. “upstream” jelként funkcionál a c-Fos számára, így a BDNF megnövekedett expressziója az agyban a c-Fos expressziójának növekedését vonja maga után (56). Kutatásunk során mi ezzel ellentétben nem tudtuk megerősíteni a BDNF mRNS és fehérje mennyiségének növekedését egy órával az ultrahang stimuláció után E18,5 korban (**6. ábra**), azonban az ismétlődő ultrahang stimuláció nagymértékben megnövelte mind a BDNF, mind a c-Fos expresszióját (**7. ábra**). A bizonyítékok azt mutatják, hogy a c-Fos szintjének az ultrahang ingerekre adott válaszként való növekedése valószínűleg mechanoszenzitív receptor által mediált jelátviteli útvonalakon keresztül történik (57, 58, 59) és potenciálisan a c-Fos aktivációja vezethet a BDNF expressziójának emelkedéséhez (60). Mindazonáltal fennáll annak a lehetősége is, hogy a BDNF más forrásokból, például a környező erek falából szabadul fel (61, 62). A BDNF-nek kulcsszerepe van a dendritek arborizációjában, mivel elősegíti a dendritfa kifejlődését, ugyanakkor nincs rá szükség a proliferációhoz, a túléléshez vagy a migrációhoz (63, 64). A BDNF aktiválja a PI3K-mTOR és MAPK útvonalakat, amelyek szabályozzák a dendritfa komplexitását és elrendeződését, emellett a PI3K-mTOR jelátvitel módosítja a Reelin expresszióját, amely szintén kulcsszerepet játszik a hippocampális neuronok elágazásainak kialakításában (65, 66, 67).

V.4. Az ultrahang stimulus megváltoztatja az idegi hálózatok aktivitását és morfológiáját

Az ultrahang stimulus frekvencia függő módon megváltoztatja az idegsejtek aktivitását (9, 35, 68, 69, 70). Ennek a modulációnak hosszan tartó hatásai lehetnek, ami morfológiai változásokat eredményezhet dendritikus és szinaptikus szinten egyaránt. A dendritek elágazásainak megváltozása módosíthatja a helyi neurális kapcsolatokat, ami potenciálisan a viselkedés és a kognitív funkciók megváltozásához vezethet. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a Morris vízteszt alapján az alacsony dózisú ultrahang expozíció (4 perc, 3,5 MHz, MI: 0,1, TI: 0,1) javíthatja a kognitív funkciókat patkány kölykökben. Ezzel szemben a nagyobb

dózisú ultrahang (20 perc, 3,5 MHz, MI: 1,4, TI: 1,0) használata ellenkező hatást eredményez (71). Érdeemes megjegyezni, hogy az ultrahang stimulus mechanikai tulajdonságainak megváltozása *in vitro* különböző hatásokat válthat ki az idegsejtekre (72). Hasonló eredményeket figyeltek meg egér kölyköknél, jelentős különbséget figyelve meg a E14,5-en végzett prenatális ultrahang expozíció esetén, különösen a memória és a kognitív funkciók terén. A szülés utáni növekedési és fiziológiai jellemzők azonban konzisztensek maradtak a kezelt és a kontrollcsoportokban (73).

A korábbi vizsgálatok nem elsősorban a központi idegrendszer részletes molekuláris és morfológiai változásaira összpontosítottak, azonban bebizonyosodott, hogy a prenatális ultrahang vizsgálatoknak nincs káros hatása az anyai vagy magzati perinatális kimenetelre. Ezen túlmenően ezek a vizsgálatok nem változtatják meg a normál fizikai vagy neurológiai fejlődést, és nem növelik a rosszindulatú daganatok, mentális betegségek vagy a csökkent értelmi képesség előfordulását sem (14). Következésképpen számos országban többször is kötelező ultrahang szűréseket végeznek a születés előtt (12., 18. és 32. héten). A fent említett időpontokon kívül kérésre 28 és 38 hetesen további ultrahang vizsgálatokat, valamint a terhesség bármely szakaszában (orvosi javaslat nélkül is) 3D-s vagy 4D-s „babamozit” lehet kérni (74).

Második kísérletünk során a magzati ultrahang hatásainak reprodukálása céljából a hippocampus CA1 piramis neuronjainak jelölésével végeztünk egy vizsgálatot egerekben E14,5-en, ami emberben a terhesség 11-12. hetének felel meg (39). Ennek eredményeként a vizsgálatban alkalmazott ultrahang expozíció valószínűleg mindkét fajban hasonló érési állapotban lévő idegsejteket érint. Egy korábbi kutatás szerint 6,7 MHz-es ultrahang stimulus 30 percig tartó alkalmazása potenciálisan megzavarhatja a neuroprogenitorok proliferációját, az újszülött neuronok migrációját, és befolyásolhatja a neocortex és a hippocampus laminációját. Érdeemes megjegyezni, hogy az ultrahang expozíció eltérő reakciót válthat ki a neocortex és a hippocampus neuronjaiban. A kísérleti eredmények azonban azt igazolják, hogy az ultrahang expozíció *in vivo* megváltoztatja a dendritek morfológiai jellemzőit a fejlődő piramissejteken mind a retrosplenialis kéreg 5. rétegében, mind a CA1 régióban (8, 9, 11, 75). Első kísérletünk eredményei azt mutatták, hogy a P3 5. rétegbeli piramissejteken egyetlen ultrahang stimulus a megadott paraméterekkel a dendritek számának növekedését eredményezi, a dendritfa egyéb morfometriai paraméterei azonban konzisztens jellemzőket mutattak (8). Ezek a sejtek a vizsgált P28 CA1 piramissejtekhez hasonló dendritfa szerkezettel rendelkeztek. A morfológiai tulajdonságokban megfigyelt különbségek valószínűleg a sejtek éretlenségének (P3 vs P28 kor), valamint a neuronok eltérő fejlődési stádiumainak és

típusainak (L5 vs CA1 neuronok) tulajdoníthatók. Az ultrahang által elindított jelátvitel magában foglalja több útvonal aktiválását, amelyben szerepe van nem szelektív kationcsatornáknak (például TRPA1 és TRPC1), valamint közvetlen fizikai hatásoknak. Egy tanulmány szerint a TRPC1 receptor fontos szerepet játszik a fentiekben és fokozott expressziója erősebb stimulációt eredményez, mindazonáltal az is megemlítendő, hogy ennek a fehérjének az expressziós mintázata igen eltérő az egyes neuronok között. Az ultrahang stimulus változást idéz elő a sejtmembrán és az ioncsatornák tulajdonságaiban, ami az intracelluláris Na^+ és Ca^{2+} szint növekedéséhez vezet (7, 27, 76, 77). Az intracelluláris kationszintek ezen emelkedése serkentheti a szinaptikus jelátvitelt és a neuronális elektromos aktivitást, következésképpen befolyásolhatja a neurotróf faktorok, például a BDNF aktivitását, és ezáltal befolyásolhatja az idegi plaszticitást (78). Első vizsgálatunk során, ugyanazt a módszertant és egértörzset alkalmazva kvantitatív polimeráz láncreakcióval (qPCR) (azonos korcsoportból származó teljes agy minták vizsgálata során) az igazolódott, hogy a BDNF RNS expressziós szintje egyetlen ultrahang stimulációt követően változatlan maradt, ami arra utal, hogy a BDNF gént nem befolyásolta az ultrahang alkalmazása (8). Kutatásunk eredményei ugyanakkor azt mutatták, hogy az ismétlődő diagnosztikai ultrahang expozíció a BDNF és a c-Fos fehérje szintek emelkedését eredményezi a neuronokban (8). Hatch és munkatársai tanulmányukban megjegyezték, hogy az ultrahang stimulus megakadályozza a CA1 sejtekben az életkorral összefüggő dendrit vesztést, amely az ultrahang expozíció által okozott BDNF szint növekedésnek tulajdonítható (9, 68). Nagyobb dózisu ultrahang alkalmazása a korábban részletezett paraméterekkel a kognitív funkciók csökkenését eredményezte, ezzel szemben az alacsonyabb dózisu ultrahang expozíció javította a patkányok kognitív funkcióit. Ezt a hatást az ultrahang 6., 12. és 18. embrionális napokon történt alkalmazása során figyelték meg (71). Hasonló hatást figyelték meg egereknél (időtartam: 10, 20 vagy 30 perc, 3,5 MHz, 65 mW, ISPTP = 1 W/cm², ISATA = 240 W/cm²), ahol nagy dózisu ultrahanggal történt prenatális expozíció (az embrionális 14,5. napon alkalmazva) a felnőtt egérben az agyműködés károsodásához vezetett (73). Kimutatták, hogy az ultrahang stimuláció ismétlődő alkalmazása csökkenti az Alzheimer-kórban szenvedő emberek agykérgének sorvadását (79), ami összhangban van az egereken végzett megfigyeléseinkkel.

VI. A KUTATÁS KORLÁTAI

Mivel a dendritek fejlődése az egész életen át tartó folyamat, a jelen tanulmányban bemutatott adatok kizárólag a fiatal és éretlen idegrendszerre vonatkoznak. Azt is fontos megjegyezni, hogy a sebészeti eljárás, az elektroporáció és még a GFP expressziója is befolyásolhatja a neuronok ultrahangra való érzékenységét, ezáltal potenciálisan megzavarhatta a morfometriai adatok mérését. Fontos tudomásul venni, hogy bár a rekonstruált neuronok és dendritek kiválasztását a terület szakértői végezték, ez a folyamat bizonyos fokú szubjektivitással járhat. Szintén kiemelendő, hogy vizsgálataink során egér modellt használtunk, mely nagymértékben eltér a humán központi idegrendszertől.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

A szűrés céljából végzett magzati ultrahang globálisan alkalmazott fizikai paramétere mellett már egyetlen ultrahang stimulus *in vivo* közvetlenül befolyásolja a TRPC4 pozitív kérgi piramissejtek bazális dendritjeinek számát.

Az ismétlődő ultrahang expozíció növeli a BDNF és a c-Fos fehérjék szintjét, jelezve a fent leírt morfológiai változások lehetséges molekuláris alapját.

Az ismételt ultrahang expozíció megváltoztatja a retrosplenialis cortex L5 és a hippocampus CA1 neuronok dendritjeinek szerkezeti jellemzőit.

Ismételt ultrahang expozíciót követően az egyéves egerek hippocampális formációja nagyobb vastagságot mutat a kontrollcsoportéhoz képest.

Kutatásunk azon eredménye, amely szerint a hippocampus atrophiaja kisebb mértékű az ultrahanggal stimulált egyedekben, arra enged következtetni, hogy az ismételt ultrahang hosszú távú védő hatást fejt ki az agyra. Emellett az ultrahang a dendritek morfológiára kifejtett hatása miatt is érdekes perspektívát jelenthet a regeneratív gyógyászatban, különösen a csökkent dendritszámmal jellemezhető idegrendszeri rendellenességekkel küzdő egyének számára.

VIII. SUMMARY

Neuronal development is governed by various dynamic factors that are essential for establishing functional networks. The precise coordination of intrinsic and extrinsic mechanical and chemical factors is needed. External physical stimuli have the potential to impact the early developmental stages of neurons. However, the medium and long-term consequences of these influences remain subject to comprehensive examination. Although it is recognized that ultrasound exposure can have immediate effects on neuronal activity and migration, the potential risks of repeated or prolonged exposure remain unclear. There is currently no conclusive evidence to suggest that ultrasound commonly used in gynecological practice (3-5 MHz) is harmful to the developing brain. However, it is acknowledged that it may induce moderate changes that could result in functional alterations.

In the first part of our study, a transgenic mouse model was utilized to investigate the neurobiological impacts of 3 MHz ultrasound on the developing brain. On the 14.5th embryonic day (E14.5), embryos were exposed to a brief (10 minutes long), single-dose, high-frequency ultrasound using parameters akin to those used in human fetal ultrasound imaging. At the time of their emergence (E14.5), layer 5 neurons in the retrosplenial cortex of mouse embryos were labeled with green and red fluorescent proteins by *in utero* electroporation. At the time when they were expected to reach layer 5 (E18.5), ultrasound stimulation was conducted using parameters consistent with those employed in prenatal examinations for humans. At postnatal day 3 (P3), the labeled neurons underwent morphometric analysis using NeuroLucida software. The findings revealed that the cells treated with low-intensity, 3 MHz ultrasound exhibited a significant increase in dendritic branching and elevated c-fos immunoreactivity compared to non-stimulated cells. Furthermore, at E18.5, the examined ultrasound-treated neurons displayed immunopositivity for TRPC4, a mechanosensitive receptor, implying that this receptor and its associated signaling pathways may contribute to the effects of ultrasound stimulation.

During the second part of our study, we also employed an animal model to investigate the morphological changes in the hippocampus resulting from repetitive ultrasound examination of the fetus. CA1 neurons of the hippocampus were selectively labeled using *in utero* electroporation to analyze their morphological characteristics. Ultrasound exposure induced significant alterations in several morphological properties of the basal dendritic tree.

Our findings suggest that ultrasound-induced changes in the dendritic trees of the CA1 pyramidal cells could result in increased dendritic input.

IX. IRODALOMJEGYZÉK

1. Maeda, K. (2014). Diagnostic ultrasound safety ultrasound safety indices. *J. Health Med. Informat.* 5:106.
2. Jago, J. R. (1995). Exposure criteria for medical diagnostic ultrasound: I. Criteria based on thermal mechanisms: NCRP Report No. 113, Bethesda, MD. 1992, 278 pp. *Ultrasound Med. Biol.* 21, 421–426. doi: 10.1016/0301-5629(95)90008-X
3. Lee, W. (1998). How to interpret the ultrasound output display standard for higher acoustic output diagnostic ultrasound devices. *J. Ultrasound Med.* 17, 535–538. doi: 10.1002/jum.15159
4. Callen, P. W. Norton, M. E., Scoutt, L. M., and Feldstein, V. A. (eds). (2017). *Callen's Ultrasonography in Obstetrics and Gynecology*, Philadelphia, PA: Elsevier.
5. Sheiner, E., Shoham-Vardi, I., Hussey, M. J., Pombar, X., Strassner, H. T., Freeman, J., et al. (2007). First-trimester sonography: is the fetus exposed to high levels of acoustic energy? *J. Clin. Ultrasound* 35, 245–249. doi: 10.1002/jcu.20321
6. Kurjak, A., and Chervenak, F. A. (2004). *Donald School Textbook of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. London: CRC Press.
7. Hu, Y., Zhong, W., Wan, J. M. F., and Yu, A. C. H. (2013). Ultrasound can modulate neuronal development: impact on neurite growth and cell body morphology. *Ultrasound Med. Biol.* 39, 915–925. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2012.12.003
8. Papp, T. *et al.* Ultrasound used for diagnostic imaging facilitates dendritic branching of developing neurons in the mouse cortex. *Front. Neurosci.* 16, 803356 (2022).
9. Hatch, R. J., Leinenga, G., and Götz, J. (2016). Scanning ultrasound (SUS) causes no changes to neuronal excitability and prevents age-related reductions in hippocampal CA1 dendritic structure in wild-type mice. *PLoS One* 11:e0164278.
10. Truong, T. T. *et al.* Ca(2+) signaling-mediated low-intensity pulsed ultrasound-induced proliferation and activation of motor neuron cells. *Ultrasonics* 124, 106739 (2022).
11. Ang, E. S. B. C., Gluncic, V., Duque, A., Schafer, M. E., and Rakic, P. (2006). Prenatal exposure to ultrasound waves impacts neuronal migration in mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A* 103, 12903–12910. doi: 10.1073/pnas.0605294103
12. Sasaki, M., Yanagihara, T., Naitoh, N., and Hata, T. (2010). Four-dimensional sonographic assessment of inter-twin contact late in the first trimester. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 108, 104–107. doi: 10.1016/j.ijgo.2009.09.025

13. Kieler, H., Cnattingius, S., Palmgren, J., Haglund, B., and Axelsson, O. (2002). First trimester ultrasound scans and left-handedness. *Epidemiology (Cambridge, Mass)* 13:370. doi: 10.1097/00001648-200205000-00022
14. Torloni, M. R., Vedmedovska, N., Merialdi, M., Betrán, A. P., Allen, T., González, R., et al. (2009). Safety of ultrasonography in pregnancy: WHO systematic review of the literature and meta-analysis. *ultrasound in obstetrics & gynecology. Ultrasound Obstet. Gynecol.* 33, 599–608. doi: 10.1002/uog.6328
15. Smarr, M. M., Louis, G. M. B., Albert, P. S., Kim, S., Fuchs, K. M., Grewal, J., et al. (2018). Characterization of thermal and mechanical indices from serial ultrasound exams and associations with neonatal anthropometry: the nichd fetal growth studies. *Am. J. Perinatol.* 35, 632–642. doi: 10.1055/s-0037-1608926
16. Rakic, P., and Yakovlev, P. I. (1968). Development of the corpus callosum and cavum septi in man. *J. Comp. Neurol.* 132, 45–72. doi: 10.1002/cne.901320103
17. Clancy, B., Darlington, R. B., and Finlay, B. L. (2001). Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience* 105, 7–17. doi: 10.1016/s0306-4522(01)00171-3
18. Cooper, J. A. (2008). A mechanism for inside-out lamination in the neocortex. *Trends Neurosci.* 31, 113–119. doi: 10.1016/j.tins.2007.12.003
19. Stiles, J., and Jernigan, T. L. (2010). The basics of brain development. *Neuropsychol. Rev.* 20, 327–348. doi: 10.1007/s11065-010-9148-4
20. Lee, I. C., Lo, T.-L., Young, T.-H., Li, Y.-C., Chen, N. G., Chen, C.-H., et al. (2014). Differentiation of neural stem/progenitor cells using low-intensity ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.* 40, 2195–2206. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2014.05.001
21. Tufail, Y., Yoshihiro, A., Pati, S., Li, M. M., and Tyler, W. J. (2011). Ultrasonic neuromodulation by brain stimulation with transcranial ultrasound. *Nat. Protoc.* 6, 1453–1470. doi: 10.1038/nprot.2011.371
22. Fowler, M. A., Sidiropoulou, K., Ozkan, E. D., Phillips, C. W., and Cooper, D. C. (2007). Corticolimbic expression of TRPC4 and TRPC5 channels in the rodent brain. *PLoS One* 2:e573. doi: 10.1371/journal.pone.0000573
23. Zechel, S., Werner, S., and von Bohlen Und Halbach, O. (2007). Distribution of TRPC4 in developing and adult murine brain. *Cell Tissue Res.* 328, 651–656. doi: 10.1007/s00441-007-0388-4
24. Ibsen, S., Tong, A., Schutt, C., Esener, S., and Chalasani, S. H. (2015). Sonogenetics is a non-invasive approach to activating neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. comm.* 6:8264. doi: 10.1038/ncomms9264

25. Sun, Y., Sukumaran, P., Bandyopadhyay, B. C., and Singh, B. B. (2014). Physiological function and characterization of TRPCs in neurons. *Cells* 3, 455–475. doi: 10.3390/cells3020455
26. Redmond, L., Kashani, A. H., and Ghosh, A. (2002). Calcium regulation of dendritic growth *via* CaM kinase IV and CREB-mediated transcription. *Neuron* 34, 999–1010. doi: 10.1016/s0896-6273(02)00737-7
27. Duque, M. *et al.* Sonogenetic control of mammalian cells using exogenous Transient Receptor Potential A1 channels. *Nat. Commun.* 13(1), 600 (2022).
28. Winkler-Ferenczi, Z., Pelyvas, B., Nagy, M. *et al.* Repeated diagnostic ultrasound exposure modifies the structural properties of CA1 dendrites and alters the hippocampal transcriptome. *Sci Rep* 14, 11713 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-62621-y>
29. Loulier, K., Barry, R., Mahou, P., Le Franc, Y., Supatto, W., Matho Katherine, S., *et al.* (2014). Multiplex cell and lineage tracking with combinatorial labels. *Neuron* 81, 505–520. doi: 10.1016/j.neuron.2013.12.016
30. Navarro-Quiroga, I., Chittajallu, R., Gallo, V., and Haydar, T. F. (2007). Long-term, selective gene expression in developing and adult hippocampal pyramidal neurons using focal *in utero* electroporation. *J. Neurosci.* 27, 5007–5011. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0867-07.2007
31. Hammer, Ø., Harper, D. A. T. & Ryan, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 4(1), 9 (2001).
32. Hatanaka, Y., Yamauchi, K., and Murakami, F. (2012). Formation of Axon-dendrite polarity *in situ*: initiation of axons from polarized and non-polarized cells. *Dev. Growth Differ.* 54, 398–407. doi: 10.1111/j.1440-169X.2012.01344.x
33. Sheng, M., and Greenberg, M. E. (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4, 477–485. doi: 10.1016/0896-6273(90)90106-p
34. Miller, A. D., Chama, A., Louw, T. M., Subramanian, A., and Viljoen, H. J. (2017). Frequency sensitive mechanism in low-intensity ultrasound enhanced bioeffects. *PLoS One* 12:e0181717. doi: 10.1371/journal.pone.0181717
35. Dong, M., Wu, Y., Fan, Y., Xu, M., and Zhang, J. (2006). c-fos modulates brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in mouse hippocampal CA3 and dentate gyrus neurons. *Neurosci. lett.* 400, 177–180. doi: 10.1016/j.neulet.2006.02.063
36. McAllister, A. K., Lo, D. C., and Katz, L. C. (1995). Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron* 15, 791–803. doi: 10.1016/0896-6273(95)90171-x

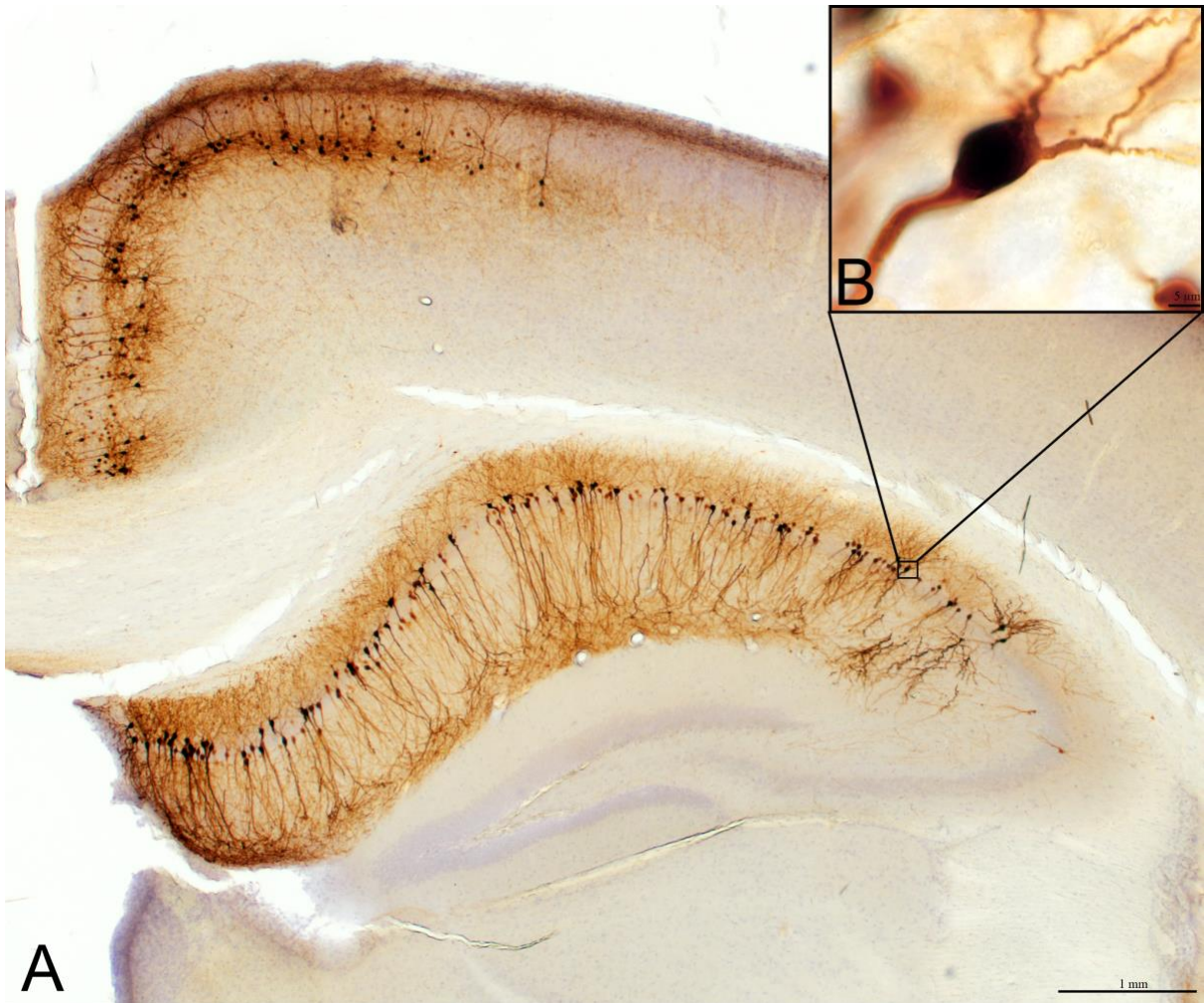
37. Grembowicz, K. P., Sprague, D., and McNeil, P. L. (1999). Temporary disruption of the plasma membrane is required for c-fos expression in response to mechanical stress. *Mol. Biol. Cell* 10, 1247–1257. doi: 10.1091/mbc.10.4.1247
38. Vann, S. D., Aggleton, J. P., and Maguire, E. A. (2009). What does the retrosplenial cortex do? *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 792–802. (innentöl discussion)
39. van den Aemele, J., Tiberi, L., Vanderhaeghen, P., and Espuny-Camacho, I. (2014). Thinking out of the dish: what to learn about cortical development using pluripotent stem cells. *Trends Neurosci.* 37, 334–342. doi: 10.1016/j.tins.2014.03.005
40. Miller, M. W. (1988). Maturation of rat visual cortex: IV. the generation, migration, morphogenesis, and connectivity of atypically oriented pyramidal neurons. *J. Comp. Neurol.* 274, 387–405. doi: 10.1002/cne.902740308
41. Hatanaka, Y., and Murakami, F. (2002). *In vitro* analysis of the origin, migratory behavior, and maturation of cortical pyramidal cells. *J. Comp. Neurol.* 454, 1–14. doi: 10.1002/cne.10421
42. Wong, W. T., and Wong, R. O. (2000). Rapid dendritic movements during synapse formation and rearrangement. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 118–124. doi: 10.1016/S0959-4388(99)00059-8
43. Franze, K. (2013). The mechanical control of nervous system development. *Development (Cambridge, England)* 140, 3069–3077. doi: 10.1242/dev.079145
44. Huang, X., Lin, Z., Meng, L., Wang, K., Liu, X., Zhou, W., et al. (2019). Non-invasive low-intensity pulsed ultrasound modulates primary cilia of rat hippocampal neurons. *Ultrasound Med. Biol.* 45, 1274–1283. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2018.12.012
45. Kubanek, J., Shi, J., Marsh, J., Chen, D., Deng, C., and Cui, J. (2016). Ultrasound modulates ion channel currents. *Sci. Rep.* 6:24170. doi: 10.1038/srep24170
46. Kubanek, J., Shukla, P., Das, A., Baccus, S. A., and Goodman, M. B. (2018). Ultrasound elicits behavioral responses through mechanical effects on neurons and ion channels in a simple nervous system. *J. Neurosci.* 38, 3081–3091. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1458-17.2018
47. Prieto, M. L., Firouzi, K., Khuri-Yakub, B. T., and Maduke, M. (2018). Activation of piezo1 but Not NaV1.2 channels by ultrasound at 43 MHz. *Ultrasound Med. Biol.* 44, 1217–1232. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2017.12.020
48. Ye, J., Tang, S., Meng, L., Li, X., Wen, X., Chen, S., et al. (2018). Ultrasonic control of neural activity through activation of the mechanosensitive channel MscL. *Nano. Lett.* 18, 4148–4155. doi: 10.1021/acs.nanolett.8b00935

49. Oh, S. J., Lee, J. M., Kim, H. B., Lee, J., Han, S., Bae, J. Y., et al. (2019). Ultrasonic neuromodulation *via* astrocytic TRPA1. *Curr. Biol.* 29, 3386–3401. doi: 10.1016/j.cub.2019.08.021
50. Shen, Y., Pan, Y., Guo, S., Sun, L., Zhang, C., and Wang, L. (2020). The roles of mechanosensitive ion channels and associated downstream MAPK signaling pathways in PDLIC mechanotransduction. *Mol. Med. Rep.* 21, 2113–2122. doi: 10.3892/mmr.2020.11006
51. Sorum, B., Rietmeijer, R. A., Gopakumar, K., Adesnik, H., and Brohawn, S. G. (2021). Ultrasound activates mechanosensitive TRAAK K(+) channels through the lipid membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 118:e2006980118. doi: 10.1073/pnas.2006980118
52. Sunkin, S. M., Ng, L., Lau, C., Dolbeare, T., Gilbert, T. L., Thompson, C. L., et al. (2013). Allen brain atlas: an integrated spatio-temporal portal for exploring the central nervous system. *Nucleic Acids Res.* 41, D996–D1008. doi: 10.1093/nar/gks1042
53. Tischmeyer, W., and Grimm, R. (1999). Activation of immediate early genes and memory formation. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 564–574. doi: 10.1007/s000180050315
54. Guzowski, J. F. (2002). Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus* 12, 86–104. doi: 10.1002/hipo.10010
55. Kubik, S., Miyashita, T., and Guzowski, J. F. (2007). Using immediate-early genes to map hippocampal subregional functions. *Learn Mem.* 14, 758–770. doi: 10.1101/lm.698107
56. Katche, C., and Medina, J. H. (2017). Requirement of an early activation of BDNF/c-Fos cascade in the retrosplenial cortex for the persistence of a long-lasting aversive memory. *Cereb. Cortex* 27, 1060–1067. doi: 10.1093/cercor/bhv284
57. Cui, Z., Li, D., Feng, Y., Xu, T., Wu, S., Li, Y., et al. (2019). Enhanced neuronal activity in mouse motor cortex with microbubbles' oscillations by transcranial focused ultrasound stimulation. *Ultrason. sonochem.* 59:104745. doi: 10.1016/j.ultsonch.2019.104745
58. Qiu, Z., Guo, J., Kala, S., Zhu, J., Xian, Q., Qiu, W., et al. (2019). The Mechanosensitive ion channel piezo1 significantly mediates *in vitro* ultrasonic stimulation of neurons. *iScience* 21, 448–457. doi: 10.1016/j.isci.2019.10.037
59. Qiu, Z., Kala, S., Guo, J., Xian, Q., Zhu, J., Zhu, T., et al. (2020). Targeted neurostimulation in mouse brains with non-invasive ultrasound. *cell reports. Cell. Rep.* 32:108033.
60. Lee, S., Williamson, J., Lothman, E. W., Szele, F. G., Chesselet, M. F., Von Hagen, S., et al. (1997). Early induction of mRNA for calbindin-D28k and BDNF but not NT-3 in rat hippocampus after kainic acid treatment. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 47, 183–194. doi: 10.1016/s0169-328x(97)00043-0

61. Nakahashi, T., Fujimura, H., Altar, C. A., Li, J., Kambayashi, J., Tandon, N. N., et al. (2000). Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Lett.* 470, 113–117. doi: 10.1016/s0014-5793(00)01302-8
62. Fujimura, H., Altar, C. A., Chen, R., Nakamura, T., Nakahashi, T., Kambayashi, J., et al. (2002). Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thromb. Haemost.* 87, 728–734.
63. Gorski, J. A., Zeiler, S. R., Tamowski, S., and Jones, K. R. (2003). Brain-derived neurotrophic factor is required for the maintenance of cortical dendrites. *J. Neurosci.* 23, 6856–6865. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-17-06856.2003
64. Jan, Y.-N., and Jan, L. Y. (2010). Branching out: mechanisms of dendritic arborization. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 316–328. doi: 10.1038/nrn2836
65. Dijkhuizen, P. A., and Ghosh, A. (2005). BDNF regulates primary dendrite formation in cortical neurons via the PI3-kinase and MAP kinase signaling pathways. *J. Neurobiol.* 62, 278–288. doi: 10.1002/neu.20100
66. Kumar, V., Zhang, M. X., Swank, M. W., Kunz, J., and Wu, G. Y. (2005). Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J. Neurosci.* 25, 11288–11299. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2284-05.2005
67. Jossin, Y., and Goffinet, A. M. (2007). Reelin signals through phosphatidylinositol 3-kinase and Akt to control cortical development and through mTor to regulate dendritic growth. *Mol. Cell. Biol.* 27, 7113–7124. doi: 10.1128/MCB.00928-07
68. Tufail, Y., Matyushov, A., Baldwin, N., Tauchmann, M. L., Georges, J., Yoshihiro, A., et al. (2010). Transcranial pulsed ultrasound stimulates intact brain circuits. *Neuron* 66, 681–694. doi: 10.1016/j.neuron.2010.05.008
69. Yang, F.-Y., Lu, W.-W., Lin, W.-T., Chang, C.-W., and Huang, S.-L. (2015). Enhancement of neurotrophic factors in astrocyte for neuroprotective effects in brain disorders using low-intensity pulsed ultrasound stimulation. *Brain Stimul.* 8, 465–473. doi: 10.1016/j.brs.2014.11.017
70. Liu, S.-H., Lai, Y.-L., Chen, B.-L., and Yang, F.-Y. (2017). Ultrasound enhances the expression of brain-derived neurotrophic factor in astrocyte through activation of TrkB-Akt and calcium-CaMK signaling pathways. *Cereb. Cortex (New York, NY : 1991)* 27, 3152–3160. doi: 10.1093/cercor/bhw169
71. Li, P., Wang, P.-J., and Zhang, W. (2015). Prenatal exposure to ultrasound affects learning and memory in young rats. *Ultrasound. Med. Biol.* 41, 644–653. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2014.09.015

72. Tsui, P.-H., Wang, S.-H., and Huang, C.-C. (2005). *In vitro* effects of ultrasound with different energies on the conduction properties of neural tissue. *Ultrasonics* 43, 560–565. doi: 10.1016/j.ultras.2004.12.003
73. Devi, P. U., Suresh, R., and Hande, M. P. (1995). Effect of fetal exposure to ultrasound on the behavior of the adult mouse. *Radiat. Res.* 141, 314–317.
74. Leung, K.-Y. Applications of advanced ultrasound technology in obstetrics. *Diagnostics* 11(7), 1217 (2021).
75. Tseng, H. A. *et al.* Region-specific effects of ultrasound on individual neurons in the awake mammalian brain. *iScience* 24(9), 102955 (2021).
76. Xu, K. *et al.* TRPV1-mediated sonogenetic neuromodulation of motor cortex in freely moving mice. *J. Neural Eng.* 20(1), 016055 (2023).
77. Yoo, S., Mittelstein, D. R., Hurt, R. C., Lacroix, J. & Shapiro, M. G. Focused ultrasound excites cortical neurons via mechanosensitive calcium accumulation and ion channel amplification. *Nat. Commun.* 13(1), 493 (2022).
78. Tyler, W. J., Lani, S. W. & Hwang, G. M. Ultrasonic modulation of neural circuit activity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 50, 222–231 (2018).
79. Popescu, T., Pernet, C. & Beisteiner, R. Transcranial ultrasound pulse stimulation reduces cortical atrophy in Alzheimer’s patients: A follow-up study. *Alzheimer’s Dementia (New York, N Y)* 7(1), e12121 (2021).

X. KIEGÉSZÍTŐ INFORMÁCIÓ



1. melléklet

XI. TÁRGYSZAVAK

ultrasound, dendrite, mouse, embryo, hippocampus, pyramidal cell

ultrahang, dendrit, egér, embrió, hippocampus, piramissejt

XII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Papp Tamásnak. Támogatása, útmutatása és széleskörű ismereti ezen a területen inspiráló élménnyé tették számomra ezt a kutatást.

Szeretnék továbbá köszönetet mondani mindazoknak a kollégáknak, akik részt vettek a tanulmányban, és akik nélkül nem tudtam volna befejezni ezt a kutatást.

Szeretném megköszönni a következő személyeknek: Pelyvás Bence, Mészár Zoltán, Szilágyi Bernadette, Petró Mátyás, Varga Angelika, Kókai Éva, Szücs Péter, Berényi Ervin, Oláh Gábor, Halmos Gábor, Nagy Marianna, Marosi Mária, Béresová Monika, Varga Rita, Bencze János, Englóhner Angelika.

Végezetül köszönettel tartozom családomnak a támogatásukért.

XIII. PUBLIKÁCIÓS LISTA



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK550//2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Winkler-Ferenczi Zsuzsanna
Doktori Iskola: Idegtudományi Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Winkler-Ferenczi, Z.**, Pelyvás, B., Nagy, M., Marosi, M., Béres, M., Varga, R., Bencze, J., Szűcs, P., Berényi, E., Englohner, A., Mészár, Z., Papp, T.: Repeated diagnostic ultrasound exposure modifies the structural properties of CA1 dendrites and alters the hippocampal transcriptome.
Sci. Rep. 14 (1), 1-12, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-024-62621-y>
IF: 3.8 (2023)
2. Papp, T.*, **Winkler-Ferenczi, Z.***, Szilágyi, B., Petró, M., Varga, A., Kókai, É., Berényi, E., Oláh, G., Halmos, G., Szűcs, P., Mészár, Z. M.: Ultrasound Used for Diagnostic Imaging Facilitates Dendritic Branching of Developing Neurons in the Mouse Cortex.
Front. Neurosci. 16, 1-13, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2022.803356>
* Megosztott első szerzős közlemény.
IF: 4.3





**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

További közlemények

3. Papp, T., **Winkler-Ferenczi, Z.**, Petró, M., Mészár, Z. M., Képes, Z., Berényi, E.: Disorders of neural crest derivatives in oncoradiological practice.
Transl. Cancer Res. 8 (8), 2916-2923, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.21037/tcr.2019.10.38>
IF: 0.986

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 9,086

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
8,1**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2024.11.05.

