Doktori (PhD) értekezés tézisei

A prenatális ultrahang hatása a fejlődő idegsejtek morfológiájára

Dr. Winkler-Ferenczi Zsuzsanna

Témavezető: Dr. Papp Tamás

DEBRECENI EGYETEM
Idegtudományi Doktori Iskola

Debrecen, 2025

A PRENATÁLIS ULTRAHANG HATÁSA
A FEJLŐDŐ IDEGSEJTEK MORFOLÓGIÁJÁRA

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Winkler-Ferenczi Zsuzsanna okleveles általános orvos

Témavezető: Dr. Papp Tamás, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Gaál Botond Ágoston, PhD
Dr. Valent Sándor, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Fülesdi Béla, MTA doktora
tagok: Dr. Gaál Botond Ágoston, PhD
Dr. Valent Sándor, PhD
Dr. Szatmári Szilárd Attila, PhD
Dr. Sipos Miklós, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A”épület tanterme, 2025. április 24. 13:00

1. A doktori értekezés előzményei és célkiztűzései

Az ultrahang (UH) egy olyan mechanikai hullám, amelynek frekvenciája meghaladja a 20 kHz-et, az emberi hallásérzékelés felső határát. Az orvosi diagnosztikában az alkalmazott frekvenciatartomány rendszerint 1 és 15 MHz között mozog.

Az ultrahang alkalmazása különösen fontos a szülészet-nőgyógyászat 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.

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.

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. 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.

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*, mind *in vivo* körülmények között.

Egy *in vitro* kutatás eredményei szerint a pulzatilis ultrahang expozíció átmeneti morfológiai változásokat idézhet elő az idegrendszerben, például az idegsejtek nyúlványainak visszahúzódását és a sejttest zsugorodását okozhatja.

Egy *in vivo* kísérlet során, amikor felnőtt 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. Ezek a hatások ismétlődő ultrahang-expozíció során fokozódnak, ami a neuritok átlagos hosszának jelentős növekedését és a neuroblasztok proliferációját idézheti elő.

Az ultrahang vizsgálatok időtartama általában 10-15 perc, azonban egy 3D vagy 4D "babamozi" további 30-40 perccel növelheti az eljárás hosszát. 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.

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.

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.

A neurogenezis folyamata egy jól meghatározott időbeli és térbeli mintát követ. 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 migrálódnia kell a korábban született neuronokon is. A desztinációjának megfelelően letelepszik, majd terminális differenciálódáson megy keresztül, és létrehozza szinaptikus kapcsolatait. Az első vándorló neuronok rétegét subplate-nek (SP, 6b réteg) nevezik, míg a következő rétegek (6, 5, 4 stb.) fölötte 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.

Kimutatták, hogy az ultrahang elősegíti a neuroprogenitor sejtek proliferációját, miközben korlátozza a piramissejtek migrációját a fejlődő agykéregben. Egy *in vitro* kísérlet során 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 kezelésről kimutatták, hogy mind *in vitro*, mind *in vivo* 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 sejttenyészetekben, mechanoszenzitív receptorokon és ioncsatornákon keresztül.

A tranziens receptor potenciál csatornák (TRPC-k) széles körben jelen vannak a fejlődő egér agyban, különösen a kortikális lemezben. Korábbi tanulmányok szerint a TRPC4 aktiválható ultrahanggal 2 MHz-nél magasabb frekvenciákon, 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 (C. elegans), a vad típusú állatok érzéketlennek bizonyultak az alacsony nyomású ultrahangra, ezzel szemben megállapították, hogy a TRPC-4 mechanotranszdukciós csatorna pórusképző alegységének normálisnál nagyobb mértékű expressziója érzékenyíti az idegsejteket az ultrahangos stimulusra, ami viselkedési válaszokat eredményezett.

Mint nem szelektív kation csatorna, amely elsősorban az endoplazmatikus retikulum membránjában található, a TRPC4 funkciója aktiválódáskor a citoplazma Ca^{2+}-szintjének emelése. 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.

Érdemes megjegyezni, hogy a lokális intracelluláris Ca^{2+} jelátvitel szerepet játszik a dendritek növekedésének és elágazásának befolyásolásában, valószínűleg a CREB és a CaM kinázt érintő útvonalakon keresztül. 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.

A TRPC-k aktiválása a BDNF mellett a c-Fos korai válaszgén emelkedett szintjéhez vezet, ami fokozott neuronális aktivitásra utal. 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 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.

Célkitűzés

Célunk, hogy *in vivo* egerekben megvizsgáljuk a mechanoszenzitív TRPC4 receptor expresszióját fejlődő kérgi neuronokban, továbbá jellemezzük a szülészeti gyakorlatban alkalmazott alacsony intenzitású, 3 MHz frekvenciájú ultrahang hatását a retrosplenialis cortex piramis 5. rétegének neuronjaira. Kutatásunk második szakaszában a repetitív magzati ultrahangnak a CA1 piramissejtek morfológiájára gyakorolt hatását, valamint hosszú távon a teljes agy térfogatára, súlyára és a hippocampus szerkezetére kifejtett hatásait tanulmányozuk.

2. Anyagok és módszerek

1. Állatok, minták gyűjtése

A kísérletek során CD1 (ICR, Charles River, Németország) egereket használtunk.

Az ultrahanggal kezelt (a részleteket lásd az „Ultrahang expozíció” c. részben) és a kontrollcsoportból egyaránt összegyűjtöttük azokat a központi idegrendszeri mintákat, amelyek erős GFP jelölődést mutattak. A citoplazmatikus GFP felhasználása megkönnyítette a jelölést, lehetővé téve a neuronok értékelését (a GFP jelölés részleteit lásd alább a „Plazmidok” c. részben). A vizsgálat során a kontrollcsoport olyan állatokból állt, amelyek ugyanazon eljárásokon estek át, mint az ultrahanggal kezeltek, azonban nem voltak kitéve ultrahang stimulusnak. Mind a kezelt, mind a kontrollcsoportban csak nőstény állatokat vizsgáltunk.

2. Plazmidok

A kollaborációs laboratórium egy expressziós vektort tervezett és szerkesztett, amely az EGFP szekvenciát kódolja, és egy cre-rekombinázzal GFP-t expresszál CAG promóter alatt.

Ezenkívül az első vizsgálatban Cytbow vektort, egy multicisztronikus plazmidot is alkalmaztunk, mely vektor három fluoreszcens riporter expresszióját teszi lehetővé, mindegyiket különböző lox szekvenciák szabályozzák.

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 embrionális 14,5. napon a vemhes egereket nátrium-pentobarbitállal mélyaltattuk, majd hasi feltárásból szabaddá tettük a méhszarvaikat, és az

embriók jobb oldalkamrájába plazmidot tartalmazó oldatot fecskendeztünk. Ezt követően egy Electro Square Porator segítségével elvégeztük az elektroporációt. Az elektromos impulzusok továbbítása csipesz típusú elektródákkal történt. Ezt követően a hasüreget átöblítettük és a méhet a visszahelyeztük, végső lépésként a hasfalat kétrétegű varrattal zártuk.

4. Ultrahang expozíció

Mindkét kísérlet során négy nappal az *in utero* elektroporációt követően (E18,5. napon) az egereket mélyaltatásba helyeztük Na-pentobarbitállal, 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. A méhen belüli ultrahang expozícióhoz a gélt finoman a vemhes állatok hasára, a szülés utáni kezelésekhez 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 fókuszt a vemhes állatok hasának középvonalán tartottuk, hogy minden embrió esetében egyenletes expozíciót biztosítsunk. A posztnatális kezelések 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 kontrollcsoport állatait 12 hónapig hagytuk túlélni, mielőtt túlaltattuk őket. Ezt követően transzkardiálisan perfundáltuk őket 4% PFA-val, majd sóoldattal, végül az agyakat izoláltuk.

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 foszfáttal pufferolt sóoldatban lévő 4%-os paraformaldehidbe merítve fixáltuk egy éjszakán át 4 °C-on. Ezt követően az agymintákat PBS-sel mostuk, 4%-os agarózba ágyaztuk, és vibratóm segítségével 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 PBS-ben hígítottuk. Az inkubálást követően három 15 perces PBS-mosást végeztünk.

A metszeteket mindkét esetben sejtmag-specifikus DAPI-val inkubáltuk 2 órán át szobahőmérsékleten, hogy elősegítsük a rétegek határainak az azonosítását. Ezt követően a metszeteket Hydromount-tal fedtük.

A második vizsgálat során a fluoreszcens képek elkészülését követően az immunfluoreszcens jelet DAB-jelölt mintákká transzformáltuk. A fedőlemezeket PBS-ben eltávolítottuk, majd a metszeteket egy éjszakán át IgG-vel, majd avidin-biotin komplexszel inkubáltuk 2 órán keresztül. A vizualizációt a DAB peroxidáz szubsztrát készlettel végeztük a gyártó protokollja szerint.

6. Digitalizáció, neuron rekonstrukció és morfometria

Első vizsgálatunkban a retrosplenialis kéreg 5. rétegbeli piramissejtek 3D rekonstrukcióját végeztük Neurolucida szoftver segítségével a konfokális képekből. A konfokális szeletek 0,5 μm vastagok voltak, ezeket 40-szeres olajimmerziós objektívvel rögzítettük FV3000 mikroszkóp segítségével. A kontroll és ultrahanggal kezelt állatok GFP-vel és Brainbow-val jelölt neuronjain 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 retrospleniális kéregben az 5. réteg legmélyebb részén található piramissejteket kifejezetten úgy választottuk ki, hogy csak az 5. rétegben lévő sejtek kerüljenek összehasonlításra. A GFP-vel és Brainbow-val jelölt piramissejtek 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 kielemzett 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. Minden rekonstrukciót egy a szakterületben jártas kutató is ellenőrzött. A DAB-ozott minták esetében specifikusan csak CA1 piramissejteket választottunk ki a Neurolucida szoftverrel való 3D rekonstrukcióhoz. A neuronok sejttestjeit aprólékosan körberajzoltuk Z síkban, és kiemelt figyelmet fordítottunk a dendritek

rekonstrukciójára, különös tekintettel azok átmérőjére. A rekonstrukciókból származó morfometriai 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. Fontos megjegyezni, hogy az elemzést végző személy nem tudta, hogy milyen mintákat rekonstruált.

7. RNS izolálás, cDNS transzkripció és qRT-PCR

Az egéragy mintákat 60 perccel az embrionális 18,5. napon (E18,5) végzett ultrahang vizsgálatot követően gyűjtöttük. A 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 egéragy szövetből végeztük. A DNS-emésztési lépéssel kiegészített standard izolálási protokoll során 30 mg agyszövetet izoláltunk, majd kvantifikáltunk és minősítettünk spektrofotométerrel. Ezt követően a teljes RNS-ből 1000 ng reverz transzkripción ment keresztül cDNS-sé, amelyet PCR-amplifikáció követett. 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 templát kontrollokat (NTC, RT-NTC, NRT) a reakció minden szakaszában.

8. Egész egéragy mintaelőkészítés kontrasztos komputertomográfiához és morfológiai mérésekhez

8-8 állatot (5 alkalommal ultrahang kezelésnek kitett és kontrollcsoport) egyéves túlélés után, Na-pentobarbitállal 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), majd dehidratálást végeztünk abszolút etanolig. A kontrasztozáshoz 1%-os tömény etanolos jódoldatot használtunk. A minták rehidratálásához leszálló alkohol sort használtunk, majd desztillált vízben öblítettük őket. Ezt követően a jódozott mintákat mikro-CT rendszerrel szkenneltük. A szkennelés időtartama 120 perc volt. A szkennelést követően a keresztmetszeti képeket a tomográfiás képekből rekonstruáltuk. 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 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 segítségével számítottuk ki.

9. Statisztikai értékelés

Az első kísérlet során a kontroll és az ultrahanggal kezelt állatok morfometriai és qPCR adatait az OriginPro Mann–Whitney U-tesztje segítségével elemeztük összehasonlítás céljából.

A második kísérlet során a kontroll és az ultrahanggal kezelt állatok morfometrikus adatait statisztikai összehasonlításnak vetettük alá Mann–Whitney U-teszt vagy Two Sample T-teszt segítségével az OriginPro és a PAST szoftver segítségével. A kisszámú mintákon végzett statisztikai összehasonlítás során Bonferroni-korrekciót alkalmaztunk, a szignifikancia szintet $p \leq 0,05$-ről $p \leq 0,017$-re igazítva. Ezenkívül a morfometriai adatok összehasonlítására MANOVA analízist végeztünk PAST szoftverrel, $p \leq 0,05$ szignifikancia szintet jelölve meg.

3. Az értekezés új tudományos eredményei

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

Az agykéregben és a hippocampusban található piramissejtek 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).

Az elektroporációt követően négy nappal később (E18,5) a jelölt piramissejtek a várt helyükre vándoroltak a retrosplenialis cortex 5. rétegében és a hippocampus CA1 régiójának piramis rétegében. A GFP-pozitív sejtek polarizált morfológiát mutattak, amelyre általában jellemző volt, hogy a migrációs vezető nyúlvány egy elágazó apikális dendritté alakult át. A GFP-vel jelölt neuronok egy részénél bazális dendritek 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. Az injektált féltekén belül a GFP-vel jelölt kérgi neuronok többsége az 5. rétegben elhelyezkedő piramissejt volt. Ennek megfelelően az ipszilaterális hippocampus a CA1 régió piramis rétegében elsősorban jelölt piramissejteket 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. 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 piramissejtek morfológiája, amelyet két dendrit típus jellemzett, a hosszú és elágazó apikális dendritek, amelyek az 1. rétegben végződtek, valamint a bazális dendritek. Megemlítendő, hogy az 5. rétegbeli piramissejtek alosztályokba sorolása a fejlődésnek ebben a korai szakaszában nem volt megvalósítható.

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. A jelölt 5. rétegbeli retrospleniális 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, kivéve a dendritek számának növekedését. 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. Ezenkívül a dendritek alakja is hasonló volt, mint a nem stimulált kontrollcsoportban. 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. Az idegsejtek arborizációja jól fejlett volt, amint az a 3D-ben rekonstruált neuronokon megfigyelhető. A prenatális ultrahang-expozíció neuronális morfológiára gyakorolt hatásának felmérésére 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 dendrithosszában, de szignifikáns volt a különbség a dendritszámot illetően, amely az ultrahanggal stimulált csoportban bizonyult nagyobbnak.

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. Egy korábbi kísérlet során 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. Feltételezik, hogy ez a növekedés elősegítheti a dendritek növekedését a retrosplenialis kéreg érésben lévő neuronjain.

Ezen hipotézis vizsgálata céljából elvégeztük a c-Fos expressziójának elemzését egyetlen, E18,5-en történt ultrahang stimulust követően. A nem stimulált kontroll minták nem mutattak immunfluoreszcens reakciót a c-Fos-ra, míg az immunreaktív jel jelentősen megnőtt

az ultrahang stimulációt követően. Az átmeneti c-Fos emelkedés a stimulációt követő 30. napon visszaállt az alapszintre, mely azonos szintű volt a kontroll egerekhez képest. Az öt alkalommal ismételt stimuláció a c-Fos expresszió aktiválását eredményezte a kéreg szinte minden sejtjében, ami nem korlátozódott csak a GFP-vel jelölt neuronokra.

Az E18,5-en a BDNF immunreaktivitás túlnyomórészt az agyhártyára és az erekre lokalizálódott. Egyetlen ultrahang stimuláció - ellentétben a c-Fos-ra gyakorolt hatással - nem eredményezett változást a BDNF immunreaktivitásában a kéregben, és 60 perccel a stimuláció után nem volt szignifikáns különbség a BDNF mRNS szintjében. Ezzel szemben a több alkalommal ismételt ultrahang stimulus alkalmazása fokozott BDNF immunreaktivitást eredményezett a retrosplenialis kéregben.

Az intrauterin ultrahang stimuláció hatással lehet az éretlen kortikális neuronok migrációs tulajdonságaira. 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. 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.

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. 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. Emellett TRPC4-immunpozitív szignálokat figyeltünk meg a GFP-vel jelölt piramissejtek nyúlványiban is, ahol az endoplazmatikus retikulum jelenléte kétséges volt. Tekintettel a TRPC4 pozitivitására a GFP-vel jelölt neuronokban, valószínű, hogy az ultrahang stimulus a citoplazmatikus Ca^{2+} koncentráció növekedéséhez vezethetett ezekben az idegsejtekben.

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

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

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.

4. 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.

Fontos megjegyezni, hogy az ultrahang morfológiai változásokat indukált nemcsak az 5. réteg, 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 kontrollcsoporthoz 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.

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. hét után. Egy korábbi tanulmány kimutatta, hogy a pre- és perinatális ultrahangnak való kitettség befolyásolja az agy fejlődésének különböző aspektusait, különösen a neuronok migrációjával kapcsolatban. 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. Tekintettel arra, hogy kutatásunk során 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. 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.

2. A mechanoszenzitivitás 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. 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. A mechanikai feszülés sejtszinten molekuláris jelátvitelt indíthat el. Különféle mechanoszenzitív csatornák, mint például a Piezo1, TRPA1, TRPC4, TRPV4, MEC-4, a kétpórusú domén káliumcsatornák (K2Ps), valamint a feszültségfüggő Na^+ és Ca^{2+} csatornák korábbi tanulmányok szerint reagáltak az ultrahangra. 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 Ca^{2+} szintnek tulajdonítható. Az embrionális egéragyban 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. 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 Ca^{2+} kiáramlást, valamint aktiválják a CaM kináz és a CREB által közvetített útvonalakat. 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.

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 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.

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 expresziójának növekedését vonja maga után. Kutatásunk során mi ezzel ellentétben nem tudtuk megerősíteni a BDNF mRNS és fehérje mennyiségének növekedését egy órával az ultrahang stimuláció után E18,5 korban, azonban az ismétlődő ultrahang stimuláció nagymértékben megnövelte mind a BDNF, mind a c-Fos expresszióját. 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 és potenciálisan a c-Fos aktivációja vezethet a BDNF expressziójának emelkedéséhez. Mindazonáltal fennáll annak a lehetősége is, hogy a BDNF más forrásokból, például a környező erek falából szabadul fel. A BDNF-nek kulcsszerepe van a dendritek arborizációjában, mivel elősegíti a dendritfa kifejlődését, ugyanakkor nincs rá szükség a proliferációhoz, a túléléshez vagy a migrációhoz.

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

Az ultrahang stimulus frekvencia függő módon megváltoztatja az idegsejtek aktivitását. 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. Érdemes megjegyezni, hogy az ultrahang stimulus mechanikai tulajdonságainak megváltozása *in vitro* különböző hatásokat válthat ki az idegsejtekre. 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.

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. 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.

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. 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. Érdemes 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. 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. 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. Az ultrahang stimulus változást idéz elő a sejtmembrán és az ioncsatornák tulajdonságaiban, ami az intracelluláris Na^+ és Ca^{2+} szint növekedéséhez vezet. 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. 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 a BDNF gént nem befolyásolta az ultrahang alkalmazása. Kutatásunk eredményei ugyanakkor azt mutatták, hogy az ismétlődő diagnosztikai ultrahang expozíció a BDNF és a c-Fos fehérje szintek emelkedését eredményezi a neuronokban. Egy korábbi tanulmány szerint az ultrahang stimulus megakadályozza a CA1 sejtekben az életkorral összefüggő dendrit vesztést, amely az ultrahang expozíció által okozott BDNF szint növekedésnek tulajdonítható. Kimutatták, hogy az ultrahang stimuláció ismétlődő alkalmazása csökkenti az Alzheimer-kórban szenvedő emberek agykérgének sorvadását, ami összhangban van az egereken végzett megfigyeléseinkkel.

5. 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.

6. Összefoglalás

A szűrés céljából végzett magzati ultrahang globálisan alkalmazott fizikai paraméterei 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 kontrollcsoporthoz képest.

Kutatásunk azon eredménye, amely szerint a hippocampus atrophiája 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.

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., Meszár, 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
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 derivates 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 tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2024.11.05.