

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**EMLŐS GERINCVELŐ MOTOROS
NEURONHÁLÓZATAINAK MORFOLÓGIAI
VIZSGÁLATA**

Wéber Ildikó

Témavezető: Dr. Birinyi András



**DEBRECENI EGYETEM
IDEGTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2012**

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés.....	7
2. Irodalmi áttekintés	10
2. 1. Központi ritmusgenerátor (CPG, Central Pattern Generator).....	10
2. 1. 1. A CPG úszó gerincesekben	10
2. 1. 1. 1. CPG a béka embrióban (Xenopus laevis).....	10
2. 1. 1. 2. CPG az orsóhalban (Lampetra fluviatilis)	12
2. 1. 2. A CPG emlősben	14
2. 1. 2. 1. Az emlős CPG lokalizációja	14
2. 1. 2. 2. Az emlős CPG felépítése	15
2. 1. 2. 3. CPG modellek	16
2. 2. Utolsó-rendű premotor interneuronok (LOPI, last-order premotor interneuron)	21
2. 2. 1. A ritmus létrehozásában szerepet játszó, serkentő tulajdonságú LOPI-ok.....	22
2. 2. 2. A flexor-extensor koordináció létrehozásáért felelős LOPI-ok	23
2. 2. 3. A jobb és bal oldali végtagok ritmikus aktivitását szabályozó LOPI-ok	24
2. 3. Commissuralis interneuronok (CINs)	25
2. 3. 1. Commissuralis interneuronok úszó gerincesekben	25
2. 3. 1. 1. Commissuralis interneuronok béka embrióban	25
2. 3. 1. 2. Commissuralis interneuronok orsóhalban	26
2. 3. 2. Commissuralis interneuronok emlősökben	26
2. 3. 2. 1. Intrasegmentális commissuralis interneuronok	27
2. 3. 2. 2. Interssegmentális commissuralis interneuronok	29
2. 3. 2. 2. 1. Leszálló axonnal rendelkező commissuralis interneuronok	29
2. 3. 2. 2. 2. Felszálló axonnal rendelkező commissuralis interneuronok	31
3. Anyagok és módszerek	32
3. 1. Utolsó rendű premotor interneuronok	32
3. 1. 1. Utolsó rendű premotor interneuronok jelölése újszülött patkány gerincvelőben	32
3. 1. 2. LOPI-ok jelölése felnőtt patkány gerincvelőben	33
3. 1. 3. Primer afferensek jelölése felnőtt patkány gerincvelőben	34
3. 1. 4. A gerincvelő szövettani feldolgozása	35
3. 1. 5. Fénymikroszkópos vizsgálatok, a sejtek rekonstrukciója	36

3. 2. Commissuralis interneuronok	37
3. 2. 1. A sejtek jelölése	37
3. 2. 2. A jelölt CIN-ok és motoneuronok közti kapcsolatok kimutatása	38
3. 2. 3. A jelölt CIN axon terminálisok transzmittereinek azonosítása	39
4. Eredmények	41
4. 1. Utolsó rendű premotor interneuronok kapcsolatai primer afferensekkel	41
4. 1. 1. Utolsó rendű premotor interneuronok jelölése újszülött patkány gerincvelőben	41
4. 1. 1. Utolsó rendű premotor interneuronok jelölése felnőtt patkány gerincvelőben ...	45
4. 1. 3. Primer afferensek LOPI-okkal kialakított szinaptikus kapcsolatai	47
4. 2. Commissuralis interneuronok szinaptikus kapcsolatai és neurotranszmitterei	50
4. 2. 1. Commissuralis interneuronok jelölése	50
4. 2. 2. Commissuralis interneuronok morfológiája	50
4. 2. 3. Commissuralis interneuronok eloszlása a gerincvelőben	52
4. 2. 4. Kapcsolat a gerincvelő két oldalán jelölődött commissuralis interneuronok között	54
4. 2. 5. Commissuralis interneuronok kapcsolatai motoneuronokkal	55
4. 2. 6. Commissuralis interneuronok neurotranszmitter tartalmának vizsgálata fluorescens jelölési technikával	57
5. Megbeszélés	63
5. 1. Utolsó rendű premotor interneuronok és primer afferensekkel létesített kapcsolataik	63
5. 1. 1. Utolsó rendű premotor interneuronok és primer afferensek jelölése	63
5. 1. 2. Primer afferensektől monoszinaptikus bemenetet fogadó LOPI-ok	64
5. 1. 3. Szenzoros információk hatása a LOPI-ok működésére	65
5. 2. Commissuralis interneuronok	66
5. 2. 1. Commissuralis interneuronok jelölése	66
5. 2. 2. Utolsó rendű commissuralis interneuronok megoszlása és morfológiája	68
5. 2. 3. Kétoldali commissuralis interneuronok közti reciprok kapcsolatok	70
5. 2. 4. Commissuralis interneuronok neurotranszmitterei	71
5. 2. 4. 1. Serkentő commissuralis interneuronok	71
5. 2. 4. 2. Gátló commissuralis interneuronok	72
6. Összefoglalás	76
Summary	77
7. Irodalomjegyzék	78
8. Saját közlemények jegyzéke	90

9. Tárgyszavak	94
10. Köszönetnyilvánítás	95
11. Függelék	96

Az értekezésben előforduló rövidítések jegyzéke

ABC:	avidin-biotin komplex
aCIN:	felszálló axonnal rendelkező commissuralis interneuron
ACSF:	mesterséges agy-gerincvelői folyadék
adCIN:	felszálló és leszálló axonnal is rendelkező commissuralis interneuron
AMPA:	α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate
bCIN:	elágazódó axonnal rendelkező commissuralis interneuron
b-GAR:	biotinilált kecskében termeltetett nyúl ellenes antitest
BDA:	biotinilált dextrán amin
Chx10:	Caenorhabditis elegans ceh 10-es homeodomén
CIN:	commissuralis interneuron
CPG:	központi ritmusgenerátor
CTB:	koleratoxin β -alegység
D:	dorsalis
DAB:	diaminobenzidin
DAR-Alexa:	Alexával kapcsolt számarban termeltetett nyúl ellenes antitest
DAS-Alexa:	Alexával kapcsolt számarban termeltetett birka ellenes antitest
dCIN:	leszálló axonnal rendelkező commissuralis interneuron
Dbx1:	fejlődő agyi 1-es típusú homeobox gén
En1:	engrailed 1 homeobox gén
Evx1:	1-es even skipped homeotikus gén
GABA:	γ -aminovajsav
GAD:	glutaminsav-dekarboxiláz
GAGp-Alexa:	kecskében termeltetett Alexával kapcsolt tengerimalac ellenes antitest
GFP:	zölden fluoreszkáló fehérje
GLYT:	glicin transzporter
HB9:	9-es homeobox gén
HRP:	tormaperoxidáz
5-HT:	5-hydroxytryptamin, szerotonin,
INPF-E:	extensor mintázatgenerátor centrumhoz tartozó gátló interneuron
INPF-F:	flexor mintázatgenerátor centrumhoz tartozó gátló interneuron
INRG-E:	extensor ritmusgenerátor centrumhoz tartozó gátló interneuron

INRG-F:	flexor ritmusgenerátor centrumhoz tartozó gátló interneuron
IPSP:	gátló posztszinaptikus potenciál
IRG-E:	extensor ritmusgenerátor centrumhoz tartozó serkentő interneuron
IRG-F:	flexor ritmusgenerátor centrumhoz tartozó serkentő interneuron
L:	lumbalis
LOPI:	utolsó rendű premotor interneuron
MLR:	mesencephalikus motoros terület
MN:	motoneuron
NGS:	normál kecske szérum
NHS:	normál ló szérum
NMDA:	N-methyl-D-aszpartát sav
PA:	primer afferens
Pax6:	6-os páros box gén
PG-E:	extensor mintázatgenerátor
PG-F:	flexor mintázatgenerátor
RG-E:	extensor ritmusgenerátor
RG-F:	flexor ritmusgenerátor
RF:	formatio reticularis
S:	sacralis
sCIN:	szegmentális commissuralis interneuron
Sox14:	14-es SRY-boksz gén
TAG 1:	1-es típusú átmenetileg termelt axonális glikoprotein
TPBS:	TRIS foszfát puffer
TRIS:	TRIS puffer
UBG:	egyedi ritmusgenerátor
UPF:	egyedi mintázatgenerátor
VGLUT:	vezikuláris glutamát transzporter
VL:	ventrolateralis
VM:	ventromedialis
WGA:	búzacsíra agglutinin

Az itt nem szereplő rövidítéseket a megfelelő ábrák alatt értelmezzük.

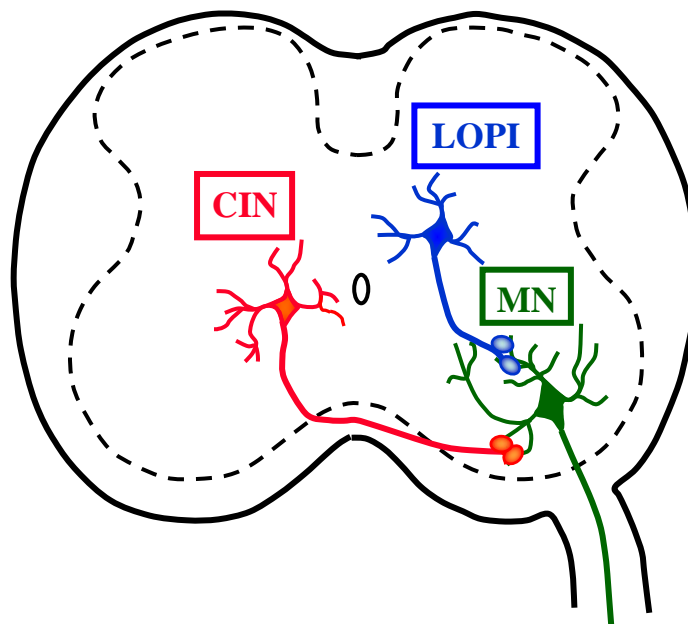
1. BEVEZETÉS

Régóta ismert, hogy a különböző ritmikus mozgások létrehozásáért az idegrendszer központi ritmusgenerátornak (central pattern generator, CPG) nevezett neuronhálózatai felelősek. Ilyen neuroncsoportot találtak például a rákok stomatogastrikus ganglionjában, amely a gyomor izmainak működését irányítja (Selverston, 1977) és a gerinces agytörzsben a nyúltvelő rostralis ventrolateralis területén elhelyezkedő ún. preBötzinger magcsoportban, amely a légzőmozgás ritmusának létrehozásáért felelős (Smith és mtsai, 1991; Gray és mtsai, 1999, 2001). A gerincvelőben leírt hasonló neuronhálózatok olyan ritmikus mozgások kialakítását végzik, mint az úszás, járás vagy vakaródzás (Delcomyn, 1980; Grillner, 1985), melyek neuronális hátterét a gerincvelői motoneuronok összehangolt akcióspotenciál mintázatai képezik. A gerincvelői CPG hálózatot alkotó serkentő és gátló interneuronok a mozgás típusától függően képesek a gerincvelői motoneuronok alternáló (járás), illetve szinkron (ugró mozgás) aktivitásának kiváltására. Kimutatták, hogy a gerincvelő a magasabb motoros központoktól és a perifériáról érkező szenzoros információk hiányában is képes a törzs- és végtagizmok térben és időben koordinált motoros működésének irányítására (Grillner és Zangger, 1979; Delcomyn, 1980).

A gerincvelői motoros rendszer kutatása a múlt század elején indult (Graham Brown, 1911), majd az 1970-es évektől kezdődő vizsgálatokban, orsóhalban (*Lampetra fluviatilis*) és béka embrióban (*Xenopus laevis*) részletesen leírták az úszómozgásért felelős gerincvelői CPG struktúráját és működését (Roberts és mtsai, 1998; Buchanan és Kasicki, 1999; Grillner és Wallén, 2002). Az emlősök gerincvelői motoros hálózata azonban jóval összetettebb, hiszen itt négy végtag különböző ízületeiben kell a flexor és extensor izmok működését térben és időben összehangolni. Az 1980-as évektől kezdődően azonban ismereteink az emlős CPG-ről rohamosan gyarapodtak, köszönhetően az egyre újabb morfológiai, fiziológiai és genetikai módszerek használatának (Kudo és Yamada, 1987; Barajon és mtsai, 1992; Casalets és mtsai, 1996; Kjaerulff és Kiehn, 1996; Kremer és Lev-Tov, 1997; Cowley és Schmidt, 1997; Beato és Nistri, 1999; Kiehn, 2006; Rybak és mtsai, 2006).

Célkitűzések

Jelen munka az emlős motoros CPG működésének pontosabb leírásához próbál hozzájárulni. Kísérleteinkben a mozgató működésekért felelős neuronális hálózat két tagját az utolsó rendű premotor interneuronokat (LOPI, last-order premotor interneuron) és a commissuralis interneuronokat (CIN) vizsgáltuk újszülött és felnőtt patkány gerincvelőben morfológiai módszerek alkalmazásával (1. ábra).



1. ábra: A vizsgált sejtek és kapcsolataik vázlatos ábrázolása. LOPI = utolsó rendű premotor interneuron, CIN = commissuralis interneuron, MN = motoneuron.

A premotor interneuronok a CPG hálózataiban kialakított ritmust közvetítik monoszinaptikus kapcsolatokon keresztül a motoneuronok felé. Mi ezen sejtek egyik fontos bemeneti forrását vizsgálva azt néztük, hogy:

- Milyen arányban fogadnak a LOPI-ok bemenetet a perifériáról érkező primer afferensektől?

A CPG hálózat egy másik tagjával, a bal és jobb oldali végtagok alternáló mozgását biztosító commissuralis interneuronokkal kapcsolatban a következő kérdésekre kerestünk választ:

- Milyen a sejtek morfológiája és hol helyezkednek el a gerincvelőben?
- Létesítenek-e monoszínaptikus kapcsolatot ellenoldali motoneuronokkal?
- Vannak-e morfológiai bizonyítékok a kétoldali CIN-ok közötti reciprok kapcsolatokra?
- Serkentő vagy gátló tulajdonságúak, milyen neurotranszmittereket használnak?

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

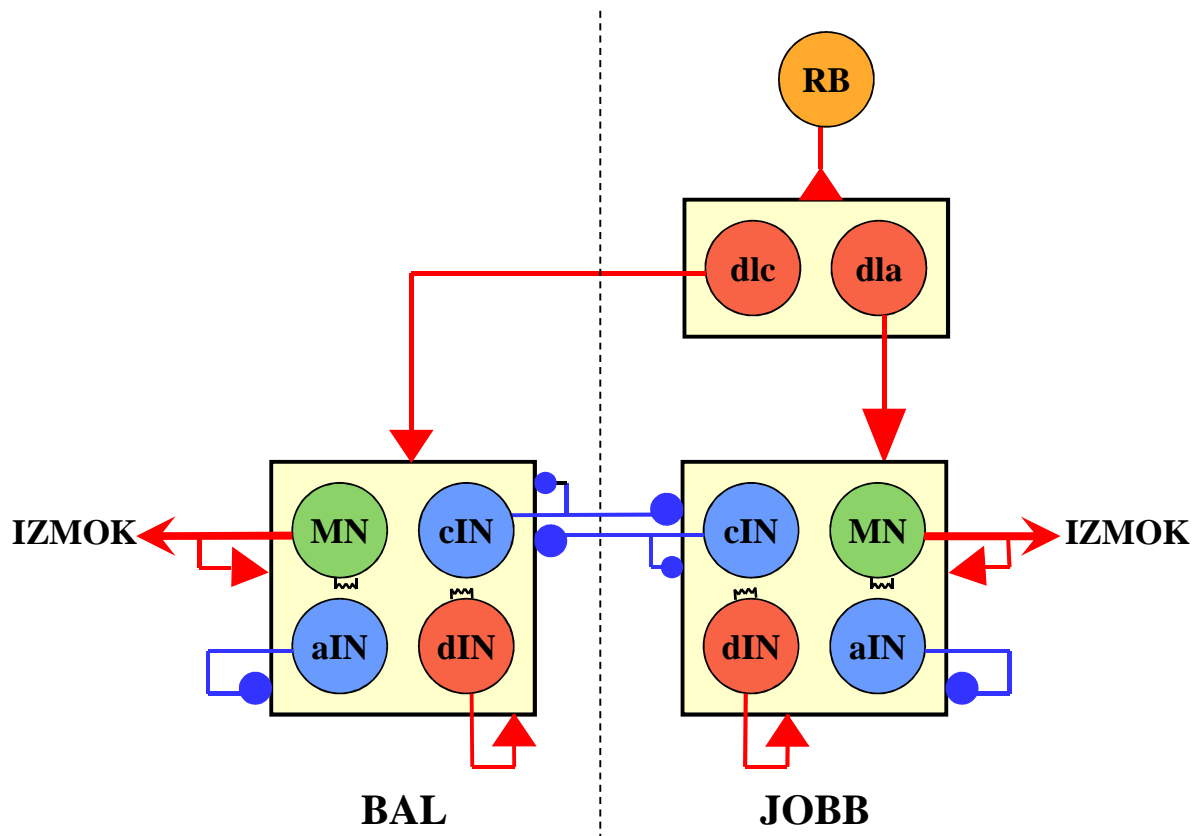
2. 1. Központi ritmusgenerátor (CPG, Central Pattern Generator)

Az emlősök, így az ember gerincvelőjében található a helyváltoztató mozgások létrehozásáért felelős alapvető neuronális hálózatok működésének megértését nehezíti az ott található sejtek sokfélesége és a köztük lévő kapcsolatok gazdagsága. Patkány embrióban 17 különböző, ipsilateralis axonnal rendelkező sejtet, és 18 féle commissuralis interneuronot (Silos-Santiago és Snider, 1992, 1994) találtak. Ezzel szemben az alacsonyabb rendű gerincesek gerincvelői hálózata jóval egyszerűbb felépítésű, így például a zebrahal lárva gerincvelőjét 9 (Bernhardt és mtsai, 1990), míg a *Xenopus* embrió gerincvelőjét mindösszesen 10 sejtípus alkotja (Li és mtsai, 2007). Ezért ezen állatok kiváló modellként szolgálnak a gerincvelői neuronok szerveződésének, valamint az úszómozgás szabályozásának leírására. Ugyanakkor a könnyebben vizsgálható fajokból levont következtetések az emlős CPG alapvető szerveződésére is rávilágíthatnak.

2. 1. 1. A CPG úszó gerincesekben

2. 1. 1. 1. CPG a béka embrióban (*Xenopus laevis*)

A dél-afrikai karmosbéka ebihal idegrendszerének viszonylagos egyszerűsége miatt kedvelt kísérleti alanya a gerincvelői mozgatórendszer tanulmányozásának. Mivel a fiktív úszómozgás az agytól izolált gerincvelőn is kiváltható, az ebihal gerincvelőjének tartalmaznia kell mindazon elemeket, amelyek az úszást létrehozzák. Sejtjelöléses vizsgálatokkal az ebihal gerincvelőjében tíz eltérő sejtcsoportot írtak le, melyek a gerincvelő két oldalán 100-300 neuronból álló hosszanti sejtszlopokat alkotnak. Az úszás létrehozásában közvetlenül résztvevő sejtek a gerincvelő marginális részén helyezkednek el, négy csoportot alkotva (**2. ábra**): motoneuronok (MN), commissuralis interneuronok (cIN), felszálló axonnal (aIN) és leszálló axonnal (dIN) rendelkező interneuronok. Mindezen sejtek ritmikusan aktívak az úszás során, ciklusonként egy akciós potenciált produkálva.



2. ábra: Az úszást létrehozó gerincvelői neuronális hálózat elemei *Xenopus* ebihalban (Li és mtsai után módosítva, 2007). MN: motoneuron, RB: Rohon-Beard neuron, cIN: commissuralis interneuron, aIN: felszálló axonnal rendelkező interneuron, dIN: leszálló axonnal rendelkező interneuron, dla: dorsolateralis interneuron, dlc: dorsolateralis commissuralis interneuron. A serkentő kapcsolatokat nyilak, a gátló kapcsolatokat körök jelzik. Az ellenállás szimbólumai elektromos szinapszisokat jeleznek. A szaggatott vonal a középvonalat szemléltet. Részletesen a szövegben.

Amikor a bőrt megérintjük, a gerincvelő dorsalis részén elhelyezkedő bőr mechanoreceptor Rohon-Beard (RB) sejtek két, szenzoros sejtípust aktiválnak: a dorsolateralis felszálló axonnal rendelkező interneuronokat (dla) és a dorsolateralis commissuralis interneuronokat (dlc), melyek az excitációt a gerincvelő ipsilateralis és contralateralis oldalán elhelyezkedő CPG neuronokhoz továbbítják. A glutamáterg leszálló axonnal rendelkező interneuronok (dIN) az azonos oldali hálózat sejtjeit aktiválják, így az ipsilateralis motoneuronok serkentéséért felelősek (Dale és Roberts, 1985; Dale, 1986).

Amikor a gerincvelő egyik oldalán lévő neuronok ritmikusan aktívak, az ellenkező oldalon található neuronok gátlását a commissuralis interneuronok (cIN) biztosítják. Ezen neuronok axonjai a középvonalat keresztezve felszálló és leszálló ágat adnak, melyek a contralateralisan elhelyezkedő interneuronokat és motoneuronokat glicinerg úton gátolják.

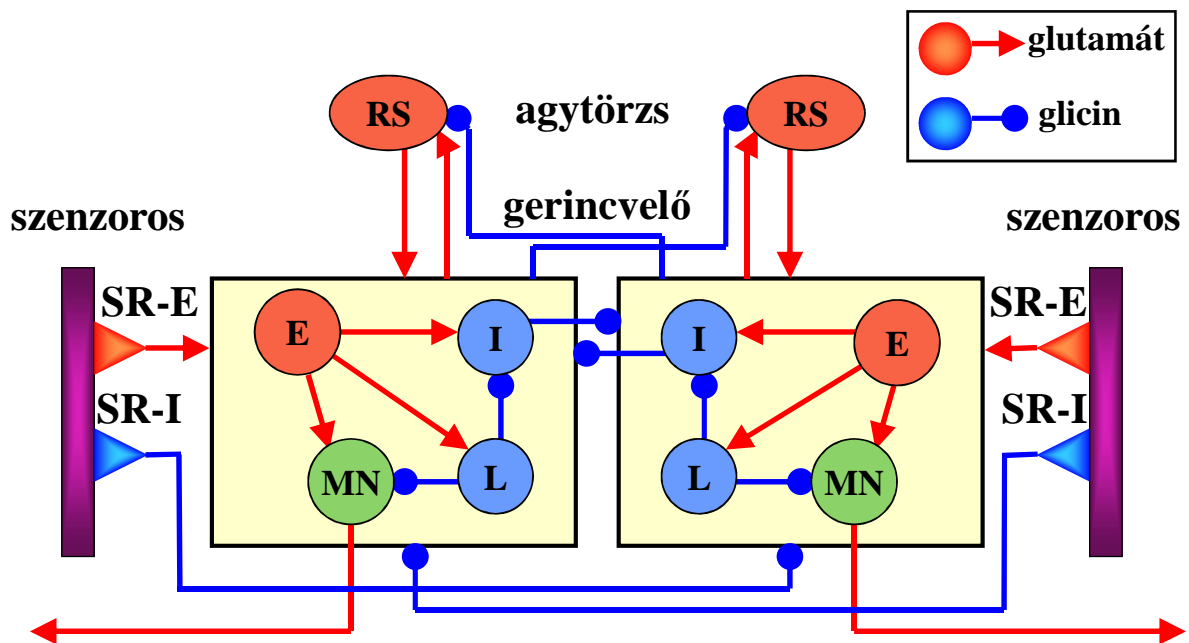
A gerincvelő két oldala közti reciprok inhibíció kulcsszerepet játszik a motoneuronok alternáló aktivitásának és az aktivitás hosszirányú terjedésének koordinálásában az úszómozgás során (Dale és Roberts, 1985; Dale, 1986; Soffe és mtsai, 2001). A CPG gátló neuronjai közül a második csoportot a felszálló axonnal rendelkező interneuronok (dla) képviselik, melyek hosszú felszálló és rövid leszálló ipsilateralis axon ággal rendelkeznek. Ezek a sejtek az embrióban GABA neurotranszmittert használnak, bár fiziológiai vizsgálatokban a petéből való kikelés idején glicin transzmitter jelenlétét is igazolták (Roberts és Alford, 1986; Li és mtsai, 2004). A felszálló axonnal rendelkező interneuronok az úszómozgás indításánál aktívak, amikor is a dorsolateralis commissuralis interneuronok (dlc) működését gátolva, megakadályozzák a bőr stimuláció által kiváltott reflex létrejöttét.

2. 1. 1. 2. CPG az orsóhalban (*Lampetra fluviatilis*)

Az úszó életmódot folytató alacsonyabb rendű gerincesek közül a másik igen kedvelt kísérleti állat az orsóhal, melynek idegrendszere mind számban, mind típusban jóval kevesebb sejtet tartalmaz, mint az emlősöké. Az orsóhal izolált gerincvelőjén glutamát agonisták alkalmazásával fiktív úszómozgást lehet kiváltani, amit a gerincvelő CPG hálózatai hoznak létre. Az orsóhal gerincvelőben az úszás során három különböző, ritmikus aktivitást mutató neuron csoportot írtak le (**3. ábra**): ipsilateralis serkentő interneuronokat (**E**), leszálló axonnal rendelkező ipsilateralis gátló sejteket (**L**), és commissuralis gátló interneuronokat (**I**).

A CPG sejtjei közül a ritmus generálásáért elsősorban az ipsilateralis axonnal rendelkező glutamát neurotranszmittert használó serkentő interneuronok felelősek (Grillner 2003). Ezen sejtek kapcsolódhatnak egymással, gátló interneuronokkal és motoneuronokkal is. A CIN-ok a contralateralis interneuronok és motoneuronok glicinerg gátlásával a kétoldali törzsizmok alternáló működésének kialakításában jelentősek (Grillner és mtsai, 1995; Roberts és mtsai, 1998).

A CPG működésére jelentős hatással vannak a szenzoros impulzusok is. A gerincvelő laterális részén olyan mechanoreceptor sejtek helyezkednek el, melyek az adott oldali izomzat megnyúlását érzékelik (**3. ábra**). Ezek az ún. stretch-receptor sejtek a mozgás során történő laterális elhajlást érzékelik és az azonos oldalon serkentik (SR-E), míg az ellenkező oldalon gátolják (SR-I) a CPG neuronok működését (Grillner és Wallén, 2002).



3. ábra: Az orsóhal motoros hálózatának sematikus ábrázolása (Grillner és Wallén után módosítva, 2002). A reticulospinalis glutamaterg neuronok (RS) a CPG-t alkotó összes sejtípus (E, I, L), valamint a motoneuronok (MN) működését serkentik. A serkentő interneuronok (E) az összes gerincvelői neuron működését serkenthetik, beleértve a gátló, glicinerg commissuralis interneuronokat (I), amelyek a contralateralisan elhelyezkedő összes sejtípus és a motoneuronok gátlását biztosítják. A lateralis interneuronok (L) az ipsilateralisan elhelyezkedő gátló interneuronok (I) és a motoneuronok gátlásáért felelősek. A stretch-receptor sejteknek két típusa van: a serkentők (SR-E) a velük ipsilateralisan elhelyezkedő neuronokat serkentik, míg a gátlóak (SR-I), melyek axonja a középvonalon átkereszteződik, a contralateralisan elhelyezkedő CPG neuronjainak működését gátolják.

Izolált orsóhal gerincvelőn, fiktív úszómozgás során végzett vizsgálatokban azt találták, hogy a CPG a teljes gerincvelő hosszán megtalálható egyedi ritmusgenerátorok (UBG= unit burst generator) összefüggő láncolata, ahol a minimális oscillációs egység 2-3 szegmentum (orsóhalban 120 a gerincvelői szegmentumok száma; Grillner és mtsai, 1995; Buchanan és Kasicki, 1999). A CPG-t alkotó neuronok a szegmentális ritmus generálásán kívül az egyedi oscillátorok közti kapcsolatok biztosításáért is felelősek, ami lehetővé teszi az aktivitás fejtől fark felé tartó terjedését, s így az orsóhal úszómozgását.

2. 1. 2. A CPG emlősben

2. 1. 2. 1. Az emlős CPG lokalizációja

Több laboratóriumban, különböző módszerekkel (sejtaktivitás jelölés, lézió, izoláció) és többféle fajban (patkány, egér, csirke, teknős, macska) elvégzett vizsgálatokban is azt találták, hogy a hátsó láb ritmikus mozgásáért felelős neuronhálózatok a lumbalis és a proximalis sacralis gerincvelői szegmentumokban találhatóak (Kudo és Yamada, 1987; Kremer és Lev-Tov, 1997; Cowley és Schmidt, 1997; Bonnot és mtsai, 2002; Christie és Whelan, 2005; Ho és Donovan, 1993; Mortin és Stein, 1989; Deliagina és mtsai, 1983). Újszülött patkányban a felső vagy az alsó gerincvelői szegmentumok szintjében alkalmazott ritmogenikus anyagok hatását vizsgálva azt tapasztalták, hogy bár a gerincvelő caudalisabb szelvényei is rendelkeznek ritmusgeneráló kapacitással, intakt állatban a sacralis hálózat működése a lumbalis hálózat által irányított (Cazalets és Bertrand, 2000). A rostralis és a caudalis szegmentumok ritmusgeneráló kapacitásában más fajoknál is különbséget találtak. A rostralis szegmentumok (L1-3 rágcsálókban, L3-5 macskában, D7-10 teknősben) minden esetben nagyobb ritmusgeneráló képességet mutatnak, mint a gerincvelő caudalis része. Ennek a rostrocaudalis gradiensnek oka lehet egyrészt az, hogy a rostralis szegmentumok több ritmikusán aktív sejtet tartalmaznak (Kjaerulff és mtsai, 1994), illetve lényegesen több intraspinalis bemenettel rendelkeznek (Berkowitz 2004). Más magyarázat szerint, a gerincvelői CPG aktivitását kiváltó két legfontosabb neurotranszmitter a szerotonin (5-HT) és a dopamin (DA) jóval nagyobb mennyiségben szabadul fel a thoracalis szegmentumban, mint lumbalisan (Jordan és Schmidt, 2002), valamint az egyik 5-HT receptor (5-HT₇) gerincvelői eloszlása is hasonló rostrocaudalis gradienst mutat (Schmidt és Jordan, 2000; Christie és Whelan, 2005).

Patkányban és macskában fiktív járómozgás során végzett sejtaktivitás-jelöléses vizsgálatokkal aktív, azaz nagy valószínűséggel a CPG-t alkotó neuronokat a gerincvelő ventromedialis részén a VI, VII, VIII-as és a canalis centralis körül a X-es Rexed laminákban találtak (Kjaerulff és mtsai, 1994; Dai és mtsai, 2005). Izolált gerincvelőn végzett léziós vizsgálatok szintén azt igazolták, hogy a gerincvelő ventralis harmada tartalmazza mindazon elemeket, melyek a koordinált ritmikus aktivitás létrehozásához szükségesek. Sagittalis irányú szeparáció során a gerincvelő lateralis része nem, vagy csak minimális ritmogenikus kapacitást mutatott, ami arra utal, hogy a CPG meghatározó elemei a gerincvelő medialis területén koncentrálódnak (Kjaerulff és Kiehn, 1996).

2. 1. 2 .2. Az emlős CPG felépítése

A *Xenopus* embrióban és az orsóhalban részletesen elemzett viszonylag egyszerű úszómozgással összehasonlítva az emlősök járása lényegesen összetettebb. Itt ugyanis az állatnak a jobb és bal oldali mellső és hátsó végtagok mozgását kell összehangolnia, miközben egy végtagon belül különböző ízületekben kell az extensor és flexor izmok megfelelő időben történő alternáló kontrakcióját kialakítani.

A járómozgást létrehozó CPG-nak 3 alapvető tulajdonságát különböztetik meg (Kiehn, 2006):

- 1.) **A ritmus létrehozását**, amelyért a vizsgált úszó életmódot folytató fajokhoz hasonlóan emlősökben is serkentő tulajdonságú, glutamáterg, ipsilateralis axonnal rendelkező neuronok felelősek. Ezek a sejtek azonban az úszó gerincesek hasonló sejtjeivel ellentétben heterogén sejtpopulációt alkotnak. Különböző vizsgálati módszerekkel több, jól elkülöníthető sejtcsoportot írtak le, mely sejtek egy része monoszinaptikusan kapcsolódik a motoneuronokkal, azaz utolsó rendű premotor interneuron.
- 2.) **Az azonos oldali flexor és extensor izmok működésének összehangolását** adott végtag azonos, vagy különböző ízületeiben. Az embernél a járás során az egyik alsó végtagon, a támasztólábon nyugszik a törzs (támasztó fázis), mialatt a másik végtagot előre lendítjük (lengő fázis). A támasztó fázis során főként az extensor, míg a lendítő fázis során a flexor izmok aktívak. A járás során a flexor és extensor izomcsoportok koordinált működtetésének eredményeként a támasztó és lengő fázisok egy végtagon belül egymást váltják. A flexor és extensor motoneuronok működésében meglévő alternáció az általuk fogadott ritmikus glicinerg gátlás és glutamáterg serkentés eredményeként valósul meg (Kiehn, 2006). Amennyiben a glicin által közvetített gátlást kiiktatjuk, a flexor és extensor motoneuronok egyszerre aktiválódnak (Beato és Nistri, 1999; Casalets és mtsai, 1996; Cowley és Schmidt 1995). A glicinerg gátlás egy része commissuralis interneuronoktól (CIN) származik, de nem ez a döntő tényező, mivel a flexor–extensor motoneuronok alternációja a commissuralis interneuron axonok átmetszését követően is megmarad (Bonnot és mtsai, 2002; Kjaerulff és Kiehn, 1997). Valószínűsíthető, hogy a flexor és extensor motoneuronok koordinációjának létrehozásában ipsilateralis gátló interneuronok a meghatározóak. Morfológiai

módszerekkel három, ritmikus aktivitást mutató és a motoneuronokkal monoszínaptikusan kapcsolódó azonos oldali gátló sejtet azonosítottak: Ia és Ib interneuronokat, Renshaw sejteket és Ia-E és Ia-F jelű interneuronokat (ld. részletesen az utolsó rendű premotor interneuronok leírásánál).

3.) A bal és jobb oldali végtagok működésének összehangolását.

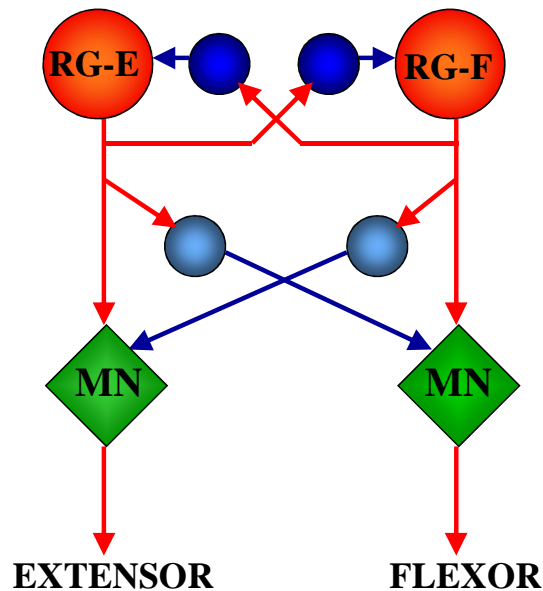
A gerincvelő két oldalán található CPG-k közötti kapcsolatot a commissuralis interneuronoknak (CIN) nevezett sejtek biztosítják, amelyek axonjai a ventralis commissurában az ellenoldalra kereszteződnek. A CIN-ok a test bal és jobb oldalán lévő izmokat ellátó motoneuronok működésének szabályozásával a kétoldali végtagok mozgásának összehangolásában meghatározóak.

Mindezen feladatok egy jól működő egységes rendszerben kell hogy megvalósuljanak. A gerincvelői motoros hálózat működésének leírásával és ennek modellezésével többen is próbálkoztak. A rendszer leírásánál alapvető a fenti három feladatot megvalósító, a CPG funkcionális egységeit alkotó neuronoknak az azonosítása és a köztük lévő szinaptikus interakciók leírása. Munkámban elsőként a CPG modelleket tekintem át, majd az általunk vizsgált két sejtípusnak, az utolsó rendű premotor interneuronoknak és a commissuralis interneuronoknak a motoros hálózaton belül betöltött szerepéről írok részletesen.

2. 1. 2. 3. CPG modellek

Thomas Graham Brown (1882-1965) a múlt század elején decerebrált és deafferentált macskákon és nyulakon végzett vizsgálatai alapján arra a következtetésre jutott, hogy a gerincvelő olyan neuronális hálózatokat tartalmaz, melyek a magasabb motoros központoktól és a perifériáról érkező információk hiányában is képesek az olyan ritmikus mozgások létrehozására és koordinálására, mint a vakaródzás és járás. Úgy feltételezte, hogy minden végtag saját, különálló ritmusgeneráló hálózattal rendelkezik, melyeket a flexor és extensor motoneuronokat irányító flexor (**RG-F**) és extensor (**RG-E**) alközpontok (half-center =fél-centrum) alkotnak. A két alközpont közti kölcsönös gátlás biztosítja, hogy adott időpontban csak az egyik centrum működjön. A létrehozott ritmust a szenzoros információk módosíthatják (Graham Brown, 1911).

A 80-as évektől kezdődően több, a gerincvelői mozgató működésben részt vevő neuronokat, illetve azok funkcióit és kapcsolataikat leíró egyszerűsített modell is született. A legelső ilyen modelleket ma **egyrétegű fél-centrum modellként** írják le (single-level half-center, **4. ábra**).



4. ábra: Az egyrétegű fél-centrum CPG modell (Graham Brown után módosítva, 1911).

A piros körök a flexor és extensor motoneuronokat irányító flexor (RG-F) és extensor (RG-E) ritmusgenerátor központokat, a kék körök a reciprok inhibícióban részt vevő gátló gerincvelői interneuron populációkat, míg a zöld rombuszok motoneuron (MN) populációkat jelölnék. A serkentő kapcsolatokat piros, a gátlókat kék színű nyilak jelzik.

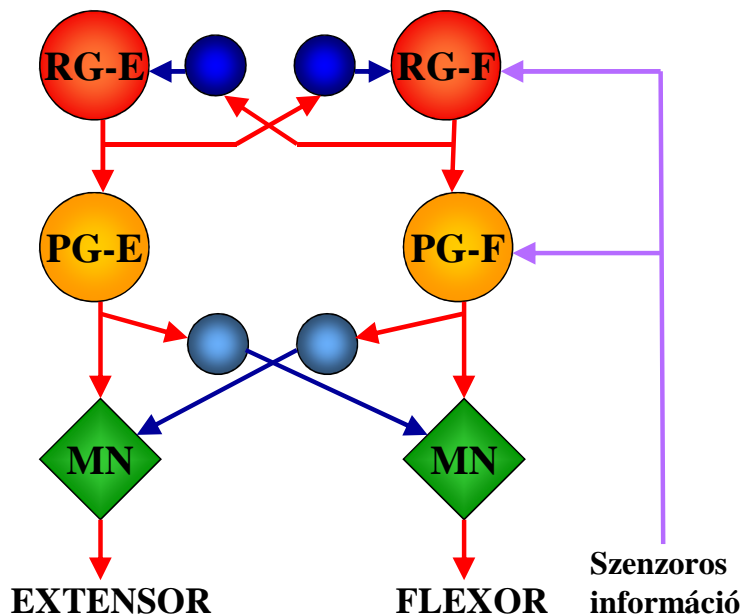
Az egyrétegű kifejezés arra utal, hogy a mozgás ritmusának és mintázatának létrehozásáért ugyanazon neuronok felelősek, egységes ritmusgenerátor központot alkotva (Roberts és mtsai, 1998).

Ma már úgy gondolják, hogy az emlős CPG igen összetett működésének több, fiziológiai kísérletekben leírt jelensége sem magyarázható az egyrétegű modellel. Főként az alábbi két jelenség értelmezése vezetett el a modell továbbgondolásához:

- 1.) Decerebrált és paralizált macska fiktív mozgása során a boka Ia extensor afferenseinek stimulációja a lépés-ciklus hosszának megváltoztatása nélkül növelte meg a cikluson belül az extensor fázis és csökkentette a flexor fázis időtartamát (Guertin és mtsai, 1995).

2.) Macska és teknős fiktív és valós mozgása során írták le az ún. „non-resetting deletio” jelenségét. Megfigyelték, hogy egyes motoneuron csoportok ritmikus aktivitása szünetelhet pár cikluson át, majd fáziseltolódás nélkül térhetnek vissza az eredeti ciklusba (Lafreniere-Roula és McCrea, 2005; Stein, 2005). Tehát a CPG-nak kell tartalmaznia olyan elemet is, ami a ritmikus motoneuron aktivitás hiányában is fenntartja a ciklusosságot.

Mindezen jelenségek magyarázatára az ún. „kétrétegű” CPG modellt (double-level) alkották meg, amelyben elkülönítik a motoneuronokkal (MN) poliszinaptikus kapcsolatban lévő ritmusgenerátor (RG) és a motoneuronokkal monoszinaptikusan kapcsolódó mintázatgenerátor (PG) sejteket (5. ábra).



5. ábra: Kétrétegű fél-centrum CPG modell, (Perret és Cabelguen után módosítva, 1988).

A piros körök a flexor (RG-F) és extensor (RG-E) ritmusgenerátor központokat, a narancs- színűek a flexor (PG-F) és extensor (PG-E) mintázatgenerátor központokat, a kék körök, pedig a reciprok inhibícióban részt vevő gátló gerincvelői interneuron populációkat szemléltetik. A zöld rombuszok motoneuron (MN) populációkat jelölnek. A serkentő kapcsolatokat piros, a gátlókat kék, a szenzoros információkat lila nyilak jelzik.

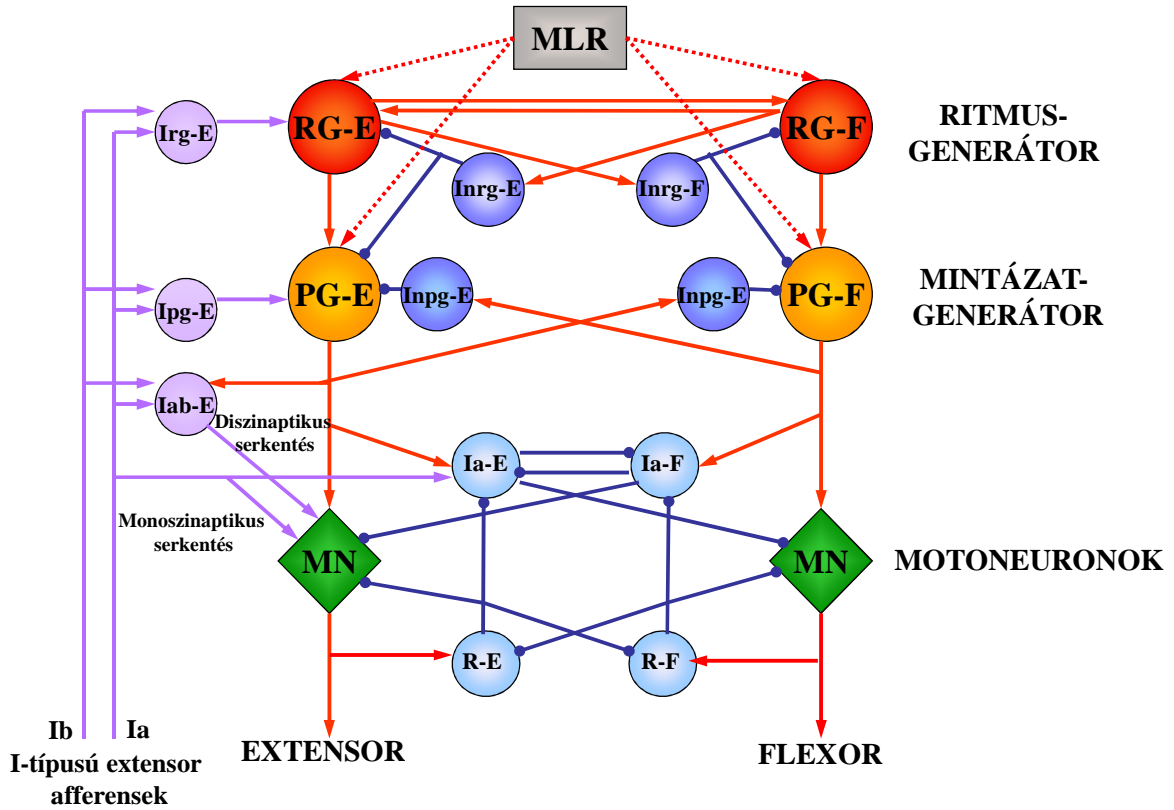
A kétrétegű modellben a ritmusgeneráló központ egymással elektronikusan kapcsolt serkentő interneuronokból áll, melyek extensor (RG-E) és flexor (RG-F) alcsoportokat alkotnak. A ritmusgenerátor hálózat alakítja ki a mozgás időbeli mintázatát, valamint meghatározza a flexor és extensor fázisok hosszát. Ennek a rétegnek a sejtjei közvetlenül kapcsolódnak a gerincvelő jobb és bal oldalán található a flexor (PG-F) és extensor (PG-E) izmok mozgási mintázatát kialakító mintázatgenerátor centrumokhoz, amelyek a kialakított ritmust a motoneuronok felé közvetítik. A mintázatgenerátor szint kisebb ritmogenikus tulajdonságú, a motoneuronokkal monoszintaptikusan kapcsolódó serkentő sejtekből áll. A RG-től fogadott bemenettől és a PG hálózaton belüli interakcióktól függően adott PG populáció a lépési ciklus bizonyos fázisában aktív, amellyel a megfelelő szinergista motoneuron csoportok szinkronizált aktivitását hozza létre (Kiehn, 2006; Rybak és mtsai, 2006).

Az afferensektől érkező visszacapcsolás révén a környezet különböző „zavaró” hatásai érvényesülhetnek a ritmusgenerátor szinten, amikor is a motoros ritmus szenvedhet zavart a ciklus eltolódása, vagy fázis kiesés következtében. Ha ugyanez a hatás a mintázatgenerátor szintjén nyilvánul meg, a motoneuronok aktivitási szintje (izomerő) változhat, illetve adott cikluson belüli flexor-extensor fázis eltolódás következhet be. A PG szinten érvényesülő „zavaró” hatás eredményeként akár bizonyos motoneuron csoportok működése szünetelhet, majd fáziseltolódás nélkül térhetnek vissza az eredeti ritmusba (non-resetting deletion).

Az egyik legújabb és legalaposabban kidolgozott modell a „2+ level” **CPG modell** (Rybak és mtsai, 2006,) nagy hangsúlyt fektet a flexor és extensor motoneuronok alternáló működésének létrehozásáért felelős sejtek, továbbá a szenzoros impulzusok közvetítéséért felelős sejtek modellbe integrálására (**6. ábra**)

A ritmusgeneráló hálózatok (RG) és a mintázatgeneráló hálózatok (PG) a kétrétegű modell két szintjét reprezentálják. Az extensor (RG-E) és flexor (RG-F) ritmusgeneráló központok közti reciprok inhibíció In_{rg-E} és In_{rg-F} gátló interneuronok által valósul meg. Amennyiben ez a gátlás blokkolt, a flexor-extensor alternációt szinkron mozgás váltja fel. A RG-E és RG-F központok közt recurrens serkentő kapcsolatok is vannak. Magát a mozgást a mesencephalicus motoros központból (MLR) származó tonikus serkentő bemenet indítja el, amely a RG és a PG szinten is érvényesülhet. A mozgás ritmusát valamint a flexor és extensor fázisok időtartamát a RG központ határozza meg, amely a PG hálózat működését közvetlen serkentés, és az In_{rg} populáció által kifejtett gátlás által kontrollálja. Ennek, az In_{rg} sejtektől származó gátlásnak a kiesése magyarázhatja pl. a „non resetting

deletio” jelenségét. A flexor (PG-F) és extensor (PG-E) mintázatgenerátor hálózatok a szinergista motoneuronok fázis-specifikus aktivációját hozzák létre. A PG szinten érvényesülő kölcsönös gátlás létrehozói az Inpg-F és Inpg-E neuronok.



6. ábra: 2+ CPG modell sematikus ábrázolása (Rybak és mtsai után módosítva, 2006).

Az ábrán a nyilak serkentő, míg a gömbök gátló kapcsolatokat jelentenek. Részletes magyarázat a szövegben.

A motoneuronok fázis-függő gátlásáért Ia-E és Ia-F interneuron csoportok felelősek. Az Ia populáció aktivitását pedig a PG szint általi serkentés, a Renshaw sejtektől (R-E és R-F) érkező gátlás és az Ia interneuronok közti kölcsönös gátló kapcsolatok határozzák meg.

Az ábra bal oldala az extensor izmok izomorsó (Ia) és ínorsó (Ib) afferenseiből érkező bemeneteket szemlélteti. Az Ia afferensektől származó aktivitás a szinergista motoneuronok monoszínaptikus serkentését és az antagonisták diszinaptikus gátlását váltja ki. A mozgás során az Ia és Ib afferensek a RG és a PG szintjén is hathatnak Inrg-E és Inpg-E neuronokon keresztül. Ezen kívül, az extensor motoneuronok fázis-függő serkentést is fogadnak az Iab-E sejtektől, melyek aktivitását az extensor fázis alatt I-es típusú szenzoros bemenetek fokozzák.

2. 2. Utolsó rendű premotor interneuronok (LOPI, last-order premotor interneuron)

A gerincvelői motoros működésekben szerepet játszó CPG hálózatnak azt az interneuron csoportját, amely a CPG által generált aktivitást monoszinaptikus kapcsolatokon keresztül a motoneuronok felé továbbítja utolsó rendű premotor interneuronoknak nevezzük (Jankowska, 1992). A LOPI-ok ugyanakkor nem csak a gerincvelői CPG felől érkező ingerületeket közvetítik a motoneuronok felé, hanem primer afferensektől, valamint agytörzsi és agykérgi eredetű leszálló rostoktól is fogadnak szinaptikus bemenetet (Jankowska, 1985; Jankowska és Zytnicki, 1985; Hongo és mtsai, 1989). Meghatározó szerepük van a különböző helyekről származó információk integrálásában, így alapvető jelentőségűek a motoros működések elindításában és fenntartásában.

Maga a premotor interneuron fogalom egy igen heterogén sejtpopulációt foglal magában, ahol a motoneuronokkal kialakított monoszinaptikus kapcsolat a közös pont. Neuronális aktivitást kimutató vizsgálatokban a motoneuronokkal egy időben aktív interneuronokat a lumbalis gerincvelői szürkeállomány VII-X-es lamináiban találták (Barajon és mtsai, 1992; Kjaerulff és mtsai, 1994). A gerincvelői szürkeállomány medialis és lateralis motoros oszlopába adott injekciót követően a motoneuronokkal monoszinaptikus kapcsolatot képző utolsó rendű premotor interneuronok döntő többsége az injekcióval ipsilateralis V-VII-es, és a contralateralis VIII-as gerincvelői laminákban helyezkedett el. A jelölt sejtek az összes lumbalis gerincvelői szelvényben megtalálhatóak voltak, bár többségük az általuk ellátott motoneuronokkal azonos szegmentumban, azokhoz viszonylag közel helyezkedett el. Somatodendritikus morfológiájuk alapján a jelölt interneuronok három típusát lehetett elkülöníteni: piramis alakú, multipoláris és kis fuziform sejteket (Puskár és Antal, 1997). Interneuron-motoneuron párokból történt extra- és intracelluláris elvezetésekől származó vizsgálatokkal különböző fiziológiai és farmakológiai sajátossággal rendelkező LOPI-okat írtak le (Kjaerulff és mtsai, 1994; Kiehn és Kjaerulff, 1996; Jonas és mtsai, 1998).

A kétrétegű CPG modellben több olyan neuroncsoportot is elkülönítettek, amelyek a gerincvelő motoros hálózatán belül más-más funkcióval bírnak, ugyanakkor monoszinaptikusan kapcsolódnak motoneuronokkal, azaz utolsó rendű premotor interneuronok (Rybak és mtsai, 2006). Ezek közé a sejtek közé sorolhatóak: **1).** a ritmus

létrehozásában szerepet játszó serkentő tulajdonságú sejtek, 2.) a flexor-extensor koordináció létrehozásáért felelős neuronok és 3.) a jobb és bal oldali végtagok ritmikus aktivitását szabályozó LOPI-ok.

2. 2. 1. A ritmus létrehozásában szerepet játszó, serkentő tulajdonságú LOPI-ok

A mintázatgenerátort alkotó sejtek a ritmusgeneráló központot alkotó sejteknél kisebb ritmogenikus kapacitással rendelkező, serkentő neuronok. A mintázatgenerátorban elhelyezkedő LOPI-ok működése a ritmusgenerátorok által szabályozott, de a magasabb motoros központoktól és a perifériáról is kapnak bemenetet (Rybak és mtsai, 2006, 2+ level CPG model). Burke és mtsai (2001) véleménye szerint viszont az utolsó-rendű premotor interneuronok sem a ritmus, sem a mintázatgenerálásnak nem aktív résztvevői, hanem egy harmadik szintet képviselnek a gerincvelői motoros hálózaton belül. A szerzők az általuk 3-rétegű-nek nevezett CPG modellben a ritmus- és mintázat generátor szinten kívül egy LOPI-okat tartalmazó 3. szintet különítenek el, melynek sejtjei a mintázatgenerátor szint sejtjeitől, a magasabb motoros központoktól és a perifériáról is fogadnak bemeneteket, majd a feldolgozott információt a motoneuronok felé továbbítják.

Ismereteink mind a mai napig hiányosak az emlős gerincvelő serkentő interneuronjaival, és azoknak a mozgás létrehozásában betöltött szerepével kapcsolatban. Morfológiai módszerekkel 2 olyan, ipsilaterális axonnal rendelkező serkentő CPG interneuron típust írtak le, melyek monoszinaptikusan kapcsolódhatnak motoneuronokkal, azaz premotor interneuronok. Macska gerincvelő alsó lumbosacralis régiójában az intermedier szürkeállomány területén olyan utolsó-rendű premotor interneuronokat találtak, melyek I-es típusú izomorsó afferensektől kapnak bemenetet és az azonos szegmentum extensor motoneuronjait serkentik (Angel és mtsai, 2005). Macska gerincvelő L3-4-es szegmentumainak intermedier szürkeállományában leírt LOPI-ok II-es típusú izomorsó afferensektől fogadnak bemenetet és a L7-es szegmentum motoneuronjait serkentik monoszinaptikusan (Edgley és Jankowska, 1987). Ezen neuronok 2/3-a a mozgás flexor fázisában aktív, fő serkentő bemenetük az agytörzsi locomotoros régiótól származik (Shefchyk és mtsai, 1990).

Genetikailag módosított egereken végzett vizsgálatokban szintén kétféle a motoneuronokkal monoszinaptikusan kapcsolódó sejtet találtak. Az egyik sejtípust a nyúlra jellemző ugráló mozgással közlekedő ephA4 és ephrinB3 knockout egerekben írták le (Dottori és mtsai, 1998). A tirozin kinázok közé tartozó ephrin receptorok membránhoz

kötött ligandjukkal az ephrinnel együtt fontos szerepet játszanak a velőcső és a paraxialis mesoderma formálódása során illetve a sejtmigráció és az axonnövekedés folyamatában. Az egér lumbalis gerincvelőjében található EphA4 receptorral rendelkező interneuronok többsége ritmikus aktivitást mutat a járómozgás során és egy részük monoszinaptikusan serkenti az azonos szegmentumbeli ipsilaterálisan elhelyezkedő motoneuronokat. Mutáns egerekben, ahol nincs jelen az axon növekedésben központi barriert képző ephrinB3, az ephrinA4-pozitív serkentő neuronok axonja a központi vonalat keresztezve megnöveli a serkentés szintjét a contralateralis gerincvelőben és így a bal-jobb oldali végtagok közti alternáló mozgást szinkron mozgássá alakítja (Butt és mtsai, 2005). Az ephA4 receptor és ephrinB3 ligand knockout egereknél megfigyelt nyúlra jellemző ugráló mozgást a járómozgásért felelős CPG genetikai rekonfigurálása okozhatja (Kullander és mtsai, 2003). A másik sejttípust transzgenikus egér embriók fejlődő gerincvelőinek lumbalis területén írták le. Itt a központi vonalhoz közel a VIII-as laminában olyan sejtpopulációt találtak, melynek tagjai HB9-et (homeobox gene 9) expresszálnak, amely megkülönbözteti őket a többi ventralis interneurontól. Ezek a mozgás során ritmikus aktivitást mutató sejtek VGLUT2 immunopozitívak és mono- vagy poliszinaptikus módon kapcsolódhatnak a motoneuronokkal (Hinckley és mtsai, 2005, Wilson és mtsai, 2005).

2. 2. 3. A flexor-extensor koordináció létrehozásáért felelős LOPI-ok

Az azonos oldali flexor és extensor motoneuronok közti megfelelő alternáció létrejötte gátló interneuronok működését igényli. Rybak és mtsai kétrétegű CPG modelljükben (6. ábra) a flexor és extensor központok közti reciprok inhibíció három szintjét különböztetik meg, melyek a flexor-extensor motoneuronok alternáló működésének meghatározó elemei lehetnek:

- 1.) az Inrg-E és Inrg-F jelű gátló interneuronok az extensor és flexor ritmusgeneráló fél-centrumok (RG-E és RG-F) közti reciprok inhibíció létrehozásában lehetnek alapvetőek,
- 2.) az Inpg-E és Inpg-F neuronok a mintázatgenerátorok szintjén megvalósuló, flexor és extensor központok (PG-E és PG-F) között létrejövő kölcsönös gátlást hozhatják létre
- 3.) a flexor-extensor koordináció harmadik szintjét az utolsó-rendű premotor interneuronok képviselik, ide tartoznak:

- 3.a)** az Ia-val és Ib-vel jelölt interneuronok, amelyek az izomorsó és ínorsó afferensektől fogadnak bemenetet és a szinergista motoneuronok monoszinaptikus serkentését váltják ki. E sejtek működése a mintázatgenerátor kontrollja alatt áll. Ezen LOPI-ok egy csoportja a ritmikus működés mellett a gerincvelői reflexek létrehozásában is részt vesz (McCrea és mtsai, 1980; Noga és mtsai, 1987; Pratt és Jordan, 1987; Burke és mtsai, 2001; Edgley, 2001; McCrea, 2001; Rybak és mtsai 2006).
- 3.b)** a Renshaw sejtek, melyek bemeneteik többségét a motoneuronok axon kollaterálisai felől kapják, s ugyanezen MN-ok működését gátolják, emellett azonban kapcsolatot képeznek az Ia interneuronokkal és az ellentétes működésű Renshaw sejtekkel is (Kiehn, 2006; Rybak és mtsai, 2006).
- 3.c)** valamint a modellben Ia-E és Ia-F jelű, a járómozgás során ritmikus aktivitást mutató olyan neuronok, melyek működését a mintázatgenerátor szint sejtjei, valamint a flexor és extensor izomorsó afferensek szabályozzák, és amelyek az antagonista motoneuron csoportok fázikus inhibícióját biztosítják (Rybak és mtsai, 2006).

Molekuláris markerekkel végzett vizsgálatok során származásuk, és az expresszált transzkripciós faktorok alapján embrionális gerincvelő ventralis részén 4 interneuron csoportot (V0, V1, V2, V3) különítettek el (Briscoe és mtsai, 1999). Ezen molekuláris markerekkel végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a Renshaw sejtek, és az Ia interneuronok az embrionális gerincvelő ventralis részén elkülönített lokális, ipsilaterális axonnal rendelkező gátló interneuronokat tartalmazó En1 (engrailed 1) transzkripciós faktort expresszáló V1 neuron populációból származnak (Sapir és mtsai, 2004; Alvarez és mtsai, 2005). Kísérleti adatok arra utalnak, hogy ezek a sejtek nem csak a flexor-extensor koordinációban, hanem a mozgás sebességének meghatározásában is részt vesznek, mivel a V1 neuronok számának csökkenése után (Pax6 knockout egerek) a járómozgás lassulását figyelték meg (Gosgnach és mtsai, 2006).

2. 2. 4. A jobb és bal oldali végtagok ritmikus aktivitását szabályozó LOPI-ok

Fiziológiai vizsgálatokban a gerincvelő két oldalán található CPG-ok közti kapcsolatot biztosító commissuralis interneuronok között leírtak olyan neuronokat, amelyek monoszinaptikus kapcsolatot alakítanak ki a motoneuronokkal, azaz egyben

utolsó-rendű premotor interneuronok is. Felnőtt patkányban a lateralis motoros oszlopba adott BDA injekció után a jelölt LOPI-ok 2-6%-a helyezkedett el az injekcióval contralateralisan, azaz bizonyult LOPCIN-nak (utolsó rendű premotor commissuralis interneuron, Puskár és Antal, 1997).

A korábban már említett transzkripciós faktorok expressziója alapján elkülönített négy gerincvelői interneuron típusból az *Evx1* (even skipped homeotic gene1) transzkripciós faktort expresszáló V0 csoportba kizárólag commissuralis interneuronok tartoznak. Knockout egereken végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a V0 interneuronok az ellenoldali motoneuronokkal monoszínaptikusan kapcsolódó GABAerg, glicinerg vagy glutamáterg sejtek, melyek kiiktatása a bal- jobb oldali alternáció zavarát okozza (Lanuza és mtsai, 2004; Pierani és mtsai, 2001).

2. 3. Commissuralis interneuronok

2. 3. 1. Commissuralis interneuronok úszó gerincesekben

Úszó gerincesekben, a *Xenopus* embrióban és az orsóhalban is igen részletesen vizsgálták a commissuralis interneuronok mozgásban betöltött szerepét. Mivel a CIN-ok kiiktatása után a motoros aktivitás mindkét fajban zavart szenvedett (Soffe, 1989; Buchanan és McPherson, 1995), valószínűsíthető, hogy a CIN-ok meghatározó elemei az úszómozgást létrehozó gerincvelői motoros hálózatnak. Anatómiai és fiziológiai vizsgálatokkal a két faj esetében különböző CIN populációkat írtak le (Butt és mtsai, 2002).

2. 3. 1. 1. Commissuralis interneuronok béka embrióban

Xenopus embrióban morfológiai módszerekkel három CIN csoportot különítettek el (Roberts és mtsai, 1990, 1998). A ventralisan elhelyezkedő, és az ellenoldali CPG sejtjeivel és a motoneuronokkal monoszínaptikus kapcsolatokat kialakító glicinerg sejtek egyik csoportja az úszómozgás során a kétoldali motoneuronok reciprok gátlásáért felelős, míg a másik ventralisan elhelyezkedő glicinerg CIN populáció a szenzoros és magasabb központoktól érkező információk integrálásában meghatározó. Az axonjaikat főként rostralis irányba küldő dorsolateralis glutamáterg CIN-ok (dlc) a test mechanikai ingerlése

után a Rohon-Beard sejtek ingerületét továbbítják a contralateralis CPG felé, így szerepük a reflexes úszómozgás elindításában jelentős.

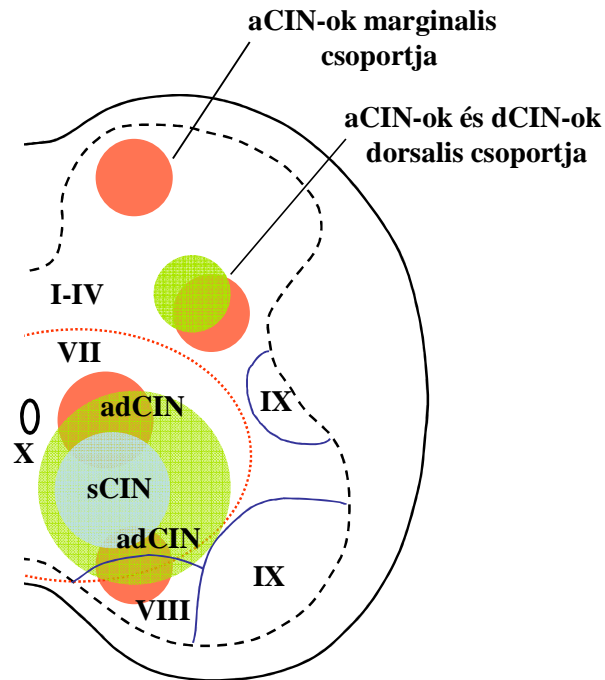
2. 3. 1. 2. Commissuralis interneuronok orsóhalban

Orsóhalban szintén több CIN populációt (CC sejtek, caudalis contralateralis) írtak le (Buchanan, 1982). A CC1 sejtek a contralateralis CPG sejtjeivel és a motoneuronokkal monoszintaptikus glicinerg kapcsolatban vannak. A CC2 sejtek szintén glicinerg, az ipsilateralis motoneuronokkal azonos fázisban aktívak. A CC3 (vagy CCE) sejtek serkentő, glutamát neurotranszmittert használó neuronok.

2. 3. 2. Commissuralis interneuronok emlősökben

Az emlősök commissuralis interneuronjai az úszó gerincesekénél jóval heterogénebb sejtpopulációt képviselnek. Léziós kísérletekből kiderült, hogy rágcsálókban a bal és jobb oldali hátsó végtagok alternációjának létrehozásáért felelős CIN-ok a gerincvelő teljes lumbalis szakaszán megtalálhatóak (Cowley és Schmidt, 1997; Kjaerulff és Kiehn 1996; Kremer és Lev-Tov, 1997). Anatómiai vizsgálatok azt mutatták, hogy a CIN-ok többsége a gerincvelői szürkeállomány ventromedialis részén (VII, VIII, X-es Rexed lamina) található, de vannak CIN-ok a hátsó szarvban is (Stokke és mtsai, 2002; Butt és mtsai, 2002; Nissen és mtsai, 2005).

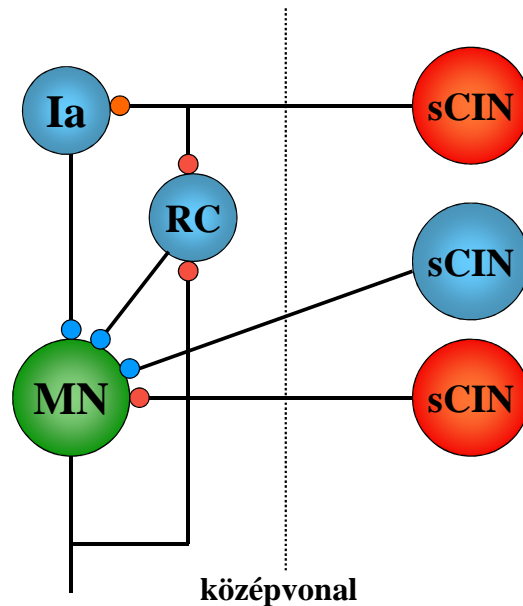
Az axonok végződési mintázata alapján a CIN-okon belül két csoportot lehet elkülöníteni: az intraszegmentális CIN-okat (sCIN, segmental vagy short-range), amelyek axonja a középvonalon áthaladva a sejttesttel azonos, vagy a szomszédos szegmentum szürkeállományában ágazódik el, és a kettő vagy több szegmentumnyi távolságig eljutó interszegmentális (long-range) CIN-okat. Az interszegmentális CIN-ok további alcsoportokra oszthatóak, vannak felszálló (ascendens, aCIN), leszálló (descendens, dCIN) és elágazódó, fel-és leszálló axonnal egyaránt rendelkező (adCIN vagy bifurcating, bCIN) populációk (7. ábra).



7. ábra: Axonális projekciójuk alapján elkülönített commissuralis interneuron csoportok gerincvelői elhelyezkedése újszülött patkány lumbalis gerincvelőjében. (Butt és mtsai után módosítva, 2002). A felszálló axonnal rendelkező CIN-okat (aCIN) piros, a leszálló axonnal rendelkezőket (dCIN) zöld, míg az elsősorban a ventromedialis szürkeállomány területén koncentrálódó intraszegmentális CIN-okat (sCIN) kék szín jelöli. Az elágazódó axonnal bíró sejtek (adCIN) az aCIN-ok centrálisan és ventralisan elhelyezkedő csoportjai közt találhatóak. A piros pontok által körülhatárolt terület a CPG neuronok feltételezett helyét jelöli. A római számok a Rexed-féle laminákat jelölik.

2. 3. 2. 1. Intraszegmentális commissuralis interneuronok (sCIN)

Az összes CIN mintegy 10-15%-a intraszegmentális (Stokke és mtsai, 2002). Újszülött patkányban végzett vizsgálatok alapján az sCIN-ok jelentős része olyan glutamáterg serkentő neuron (**8. ábra**), amely a motoneuronokkal ipsilaterálisan elhelyezkedő gátló interneuronokhoz (Ia interneuronok, Renshaw sejtek) kapcsolódik közvetlenül, és ezeken keresztül gátolja a motoneuronok működését (Kjaerulff és Kiehn, 1997; Nishimaru és mtsai, 2006; Jankowska és mtsai, 2005). Ezen kívül azonban találtak olyan glutamáterg sCIN-okat is, amelyek monoszinaptikusan kapcsolódnak az ellenoldali motoneuronokkal, serkentve azokat. A motoneuronok monoszinaptikus inhibíciója GABA- és/vagy glicinerg sCIN-ok által valósul meg. Újszülött egérben ezek a monoszinaptikus gátló sejtek az összes sCIN 20%-át adják (Quinlan és Kiehn, 2007).



8. ábra: Az intraszegmentális commissuralis interneuronok (sCIN) kapcsolatai (Kiehn után módosítva, 2006). A serkentő neuronokat és szinaptikus kapcsolatokat piros, a gátlókat kék szín jelöli. MN: motoneuron, Ia: Ia gátló interneuron, RC: Renshaw sejt

A lokális axonnal rendelkező szegmentális commissuralis interneuronok működésével kapcsolatos meghatározó kérdés az, hogy mi a szerepük akkor, amikor a végtagok alternációját azok szinkronizált mozgása váltja fel. Azt, hogy a valós mozgás során mi váltja ki a végtagok alternáló vagy szinkronizált mozgását nem tudjuk. Az egyik lehetőség az, hogy a végtagok alternáló mozgása során (pl. a járás során) a sCIN-ok poliszinaptikus gátló hatása érvényesül, míg az olyan mozgások során, amikor a végtagok szinkronban működnek (mint az ugrás vagy galopp) a serkentő sCIN-ok aktívak (Kiehn, 2006). Más elképzelés szerint a serkentő és gátló CIN-ok szimultán működnek, és az adott mozgásformának megfelelően egyikük hatása válik dominánssá. Az utóbbi hipotézist erősítik a korábban már említett nyúlra jellemző ugró mozgással közlekedő ephrin A4 és ephrin B3 knockout egereken végzett vizsgálatok, melyek szerint a keresztezett serkentő kapcsolatok erősödése eredményezi az ugrómozgást (Kullander és mtsai, 2003). A bal-jobb oldali szinkronitást alternáló mozgássá tudták alakítani a gátló CIN rendszer aktivitásának növelésével, azaz a keresztezett gátlás és serkentés közti egyensúly megváltoztatásával. Elképzelhető, hogy a leszálló noradrenerg és szerotoninerget rostok a serkentő- és gátló sCIN-ok működésének befolyásolásával a kétoldali CPG aktivitásának eltolódását hozzák létre és ennek következtében váltják ki a mozgási mintázatok változását (Hammar és mtsai, 2004; Norreel és mtsai, 2003).

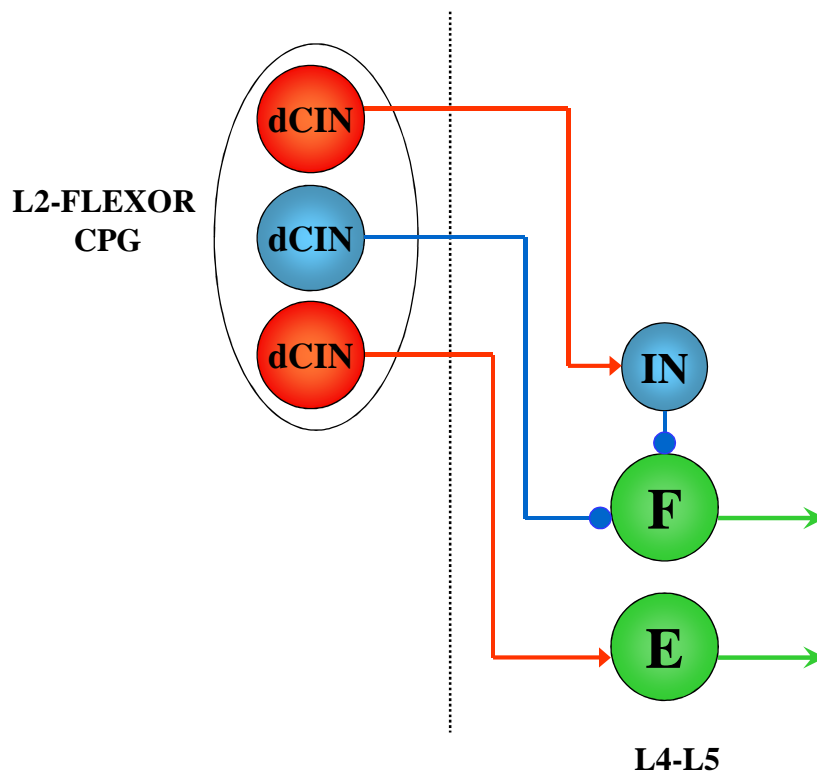
2. 3. 2. 2. Interszegmentális commissuralis interneuronok

Az interszegmentális interneuronok heterogén sejtpopulációt alkotnak: vannak csak felszálló (ascending- aCIN), csak leszálló (descending- dCIN) és elágazódó, felfelé és lefelé egyaránt haladó (bifurcating- bCIN, vagy adCIN) axonnal rendelkező alcsoportok. A hosszú projekciójú CIN-ok közel 40-40%-a aCIN és dCIN, míg az adCIN-ok 17%-ot tesznek ki (Eide és mtsai, 1999; Nakayama és mtsai, 2002; Stokke és mtsai, 2002; Bannatyne és mtsai, 2003). Az interszegmentális CIN-ok jelentős része (40%) rendelkezik olyan axon kollaterálisokkal is, amelyek a sejttestükkel azonos szegmentumban érnek véget (Eide és mtsai, 1999; Bannatyne és mtsai, 2003; Matsuyama és mtsai, 2004; Quinlan és Kiehn, 2007).

2. 3. 2. 2. 1. Leszálló axonnal rendelkező commissuralis interneuronok (dCIN)

Rágcsálókban olyan leszálló axonnal rendelkező CIN-okat vizsgáltak, amelyek a gerincvelő L2 szegmentumának ventralis szürkeállományában helyezkedtek el, axonjuk pedig contralateralisan a L4-es szegmentumig haladt (Butt és mtsai, 2002; Butt és Kiehn, 2003). Indukált járómozgás során ezen sejtek 2/3-a mutatott ritmikus aktivitást. A L4-es szegmentum motoneuronjaira kifejtett szinaptikus hatásaik vizsgálata alapján a dCIN-ok többsége monoszinaptikus glutamaterg vagy glicinerg kapcsolatot létesített a lumbalis 4-es szegmentum motoneuronjaival. Poliszinaptikus gátló kapcsolatokat szintén leírtak, melyek GABAerg interneuronokon keresztül valósultak meg (Butt és Kiehn, 2003).

A L2-es szegmentumbeli ipsilaterális flexor motoneuronokkal azonos fázisban aktív serkentő dCIN-ok monoszinaptikusan serkentik a L4-es szegmentum contralateralis extensor motoneuronjait, vagy contralateralis GABA-erg neuronokhoz kapcsolódva gátolják a L4-es szegmentum contralateralis flexor motoneuronjainak működését. A L2-es szegmentum gátló dCIN-jai pedig a L4-es contralateralis flexor motoneuronok monoszinaptikus gátlásáért felelősek (**9. ábra**). Az extensor fázisban aktív L2 szegmentumbeli dCIN-ok pedig monoszinaptikusan serkentik a L4 szegmentum contralateralis flexor MN-jait, illetve mono- és poliszinaptikus úton is gátolhatják az L4-es szegmentum extensor MN-jainak tüzelését. Az eredmények azt jelzik, hogy bár a dCIN-ok heterogén populációt alkotnak, a mozgás során azonban funkcionális egységként működnek a flexor és extensor motoneuronok működésének koordinálásában.



9. ábra: Leszálló axonnal rendelkező commissuralis interneuronok (dCIN) kapcsolatai (Butt és Kiehn és mtsai után módosítva, 2003). A glutamáterg sejtek pirosak, a gátló sejtek kékek. A szaggatott vonal a középvonalat szemlélteti. **L:** lumbalis szegmentum. **F:** flexor motoneuron. **E:** extensor motoneuron. **IN:** interneuron. A szaggatott vonal a középvonalat jelöli.

A hosszú leszálló axonnal rendelkező CIN-ok a caudalisabb szegmentumokban elhelyezkedő sejtek mellett lokális axon kollaterálisaiakon keresztül a sejtesttel azonos szegmentumbeli motoneuronokat direkt és indirekt úton serkenthetik (80%), vagy gátolhatják (15%) (Quinlan és Kiehn, 2007).

Macskában a VIII-as laminában található dCIN-ok sokban hasonlítanak a rágcsálókban leírtakra. Itt a L3-L5-ös szegmentumban találhatóak a dCIN-ok szómái, axonjaik pedig a L7-es szegmentum extensor motoneuronjaihoz kapcsolódva, azok monoszínaptikus glutamáterg serkentését, vagy glicinerg gátlását biztosítják (Jankowska és mtsai, 2003; Bannatyne és mtsai, 2003). Agytörzsi és középagyi motoros régiók stimulálása után a L4-L6-os szegmentum dCIN-jaiból a rágcsálók dCIN-jaihoz hasonló ritmikus aktivitást lehetett elvezetni, ami a két faj dCIN-jainak hasonló szerveződésére utal (Matsuyama és mtsai, 2004).

2. 3. 2. 2. 2. Felszálló axonnal rendelkező commissuralis interneuronok (aCINs)

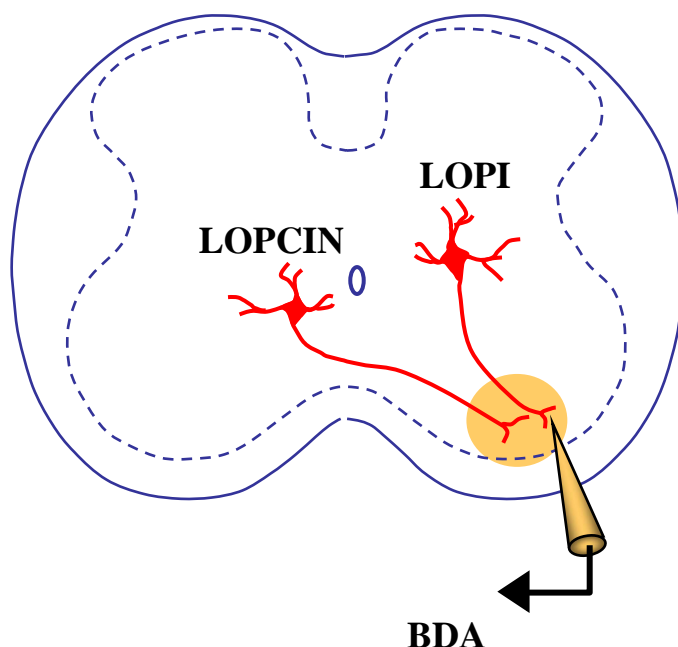
Járómozgás során ritmikusan aktív aCIN-okat mind rágcsálókban (Zhong és mtsai 2006; Carlin és mtsai, 2006), mind macskában (Matsuyama és mtsai, 2004) leírtak. Ezek a lumbalis gerincvelőben elhelyezkedő sejtek hosszú felszálló axonjaik segítségével ritmikus szignált szolgáltatnak a gerincvelő mellső végtag mozgásáért felelős neuronhálózatainak (Juvin és mtsai, 2005) és az agytörzsi formatio reticularisnak (Tran és mtsai, 2003). Újabb vizsgálatok azt mutatták, hogy a hátsó végtagi CPG-k erőteljes gátló bemenetet küldenek a mellső végtagot vezérlő CPG-k számára, ami főként a cervicalis és lumbalis gerincvelői szegmenteket összekötő felszálló CIN-okon keresztül valósul meg (Juvin és mtsai, 2005). Az aCIN-ok közel 40%-a szintén rendelkezik lokális szinaptikus kapcsolatokkal, melyek a vizsgálatok során indirekt gátló kapcsolatoknak bizonyultak (Quinlan és Kiehn, 2007).

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3. 1. UTOLSÓ RENDŰ PREMOTOR INTERNEURONOK (LOPI)

3. 1. 1. Utolsó rendű premotor interneuronok jelölése újszülött patkány gerincvelőben

Vizsgálatainkat öt újszülött (1-8 napos) patkányból (Wistar-Kyoto, Gödöllő) származó *in vitro* gerincvelőn végeztük. Az állatokat étterrel elaltattuk, decapitáltuk, majd ventralis laminectomia után a gyökereket megtartva a gerincvelőt eltávolítottuk és oxigenizált mesterséges agy-gerincvelői folyadékkal (ACSF, összetétele: 126 mM NaCl, 3 mM KCl, 26 mM NaHCO₃, 1,3 mM NaH₂PO₄, 2,0 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂ és 10 mM glükóz) átáramoltatott kamrába helyeztük. 15-20 µm hegyátmérőjű üveg mikropipettát biotinilált dextrán amin (BDA, MW:10000, Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) 10%-os oldatával feltöltöttünk, majd a festéket 5-15 µA erősségű egyenárammal 5-10 percig injektáltunk a mellső szarv lateralis részébe a L2-es és/vagy a L4-es gerincvelői szegmenstumok magasságában (**10. ábra**).



10. ábra: Utolsó rendű premotor interneuronok (LOPI), és utolsó rendű premotor commissuralis interneuronok (LOPCIN) jelölése. BDA: biotinilált dextrán amin.

A gerincvelőt még 4-8 óráig a kamrában tartottuk, mialatt a jelölő anyagot a sejtek axonjaikon keresztül a sejttestbe és dendritjeikbe transzportálták. Ezután 2,5% glutáraldehidet, 0,5% paraformaldehidet és 0,2% pikrinsavat tartalmazó 0,1M-os foszfát puffer oldatban fixáltuk.

A fixálást követően a lumbalis gerincvelőből vibrotómmal 60 µm vastagságú metszeteket készítettünk. Az úszó metszeteket az alkalmazott szérumok penetrációjának fokozására 50%-os etanol oldatba helyeztük 30 percre, majd az aspecifikus jelölés elkerülésére 10%-os normál ló szérummal (NHS, Vector Labs) blokkoltunk 50 percig. A LOPI-ok által felvett BDA láthatóvá tételéhez a metszeteket 1 éjszakán át 4 C⁰-on avidin-biotin komplexet tartalmazó oldatban (ABC, 1:100, Vector Labs, Burlingame, CA, USA), majd sötétkék színreakciót adó, nikkellel intenzifikált diamino-benzidin (DAB, 3'3' diaminobenzidin tetrahydrochlorid, SIGMA, St. Louis, MO, USA) oldatban inkubáltuk. Végül a metszeteket zselatinózott tárgylemezre helyeztük és víztelenítést követően Permounttal (Fischer Scientific, Pittsburgh, PA, USA) fedtük.

3. 1. 2. LOPI-ok jelölése felnőtt patkány gerincvelőben

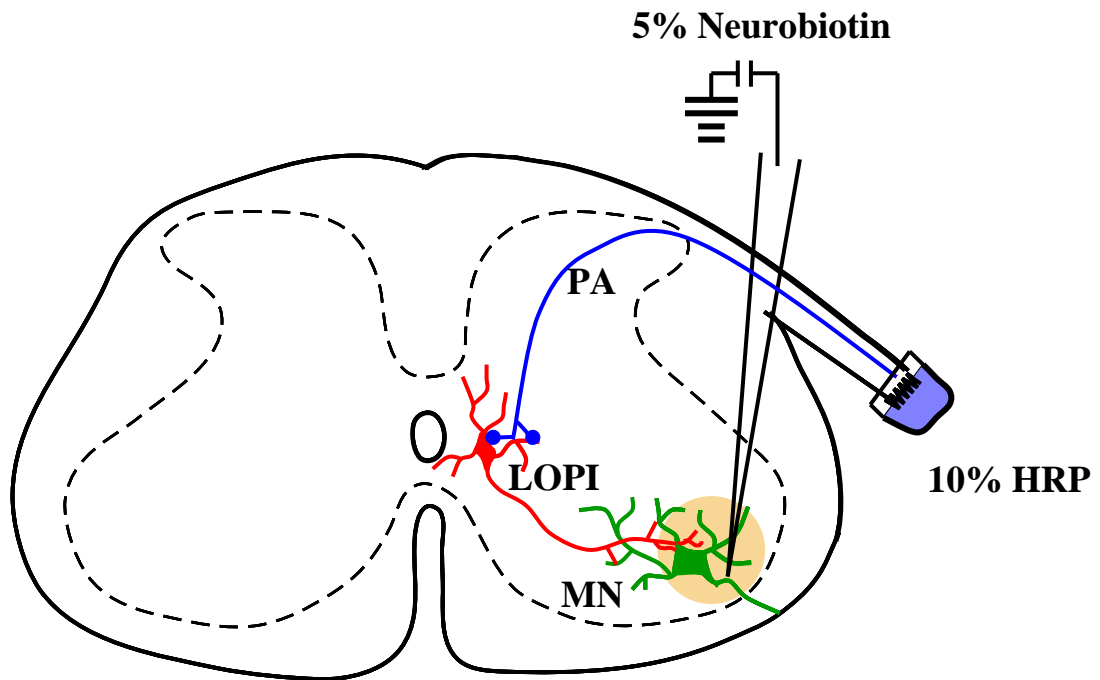
Wistar patkányokat (250-300g) nátrium-pentobarbitállal (50 mg/kg) altattunk, majd a lumbalis 3-5 szegmentumok magasságában laminectomiát végeztünk. A premotor interneuronok retrográd jelölését az alábbi két protokoll szerint végeztük:

- 1.) Három állatban Neurobiotin (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) 5%-os oldatát injektáltuk iontoforetikusan 20-30 µm hegyátmérőjű üvegpipettán 5 µA-es egyenárammal 20 percen keresztül a lateralis motoros oszlopba (**11. ábra**). A Neurobiotin detektálásához a jelölt gerincvelőből készült metszeteket 5 órán át ABC-t (1:100) tartalmazó 0,01 M-os TRIS-foszfát pufferben (TPBS, pH 7,4) inkubáltuk, majd barna színt adó, DAB kromogén reakciót végeztünk.
- 2.) Tizenegy állatban biotinilált dextrán amin (BDA, MW:10000) 10%-os oldatát injektáltuk 5 µA-es egyenárammal 20 percen keresztül a lateralis motoros oszlopba (**12. ábra**). A BDA jelölés láthatóvá tételéhez a metszeteket 5 órán át avidin-biotin komplexet (ABC, 1:100) tartalmazó 0,01 M-os TRIS-foszfát pufferben (TPBS, pH 7,4) inkubáltuk, majd sötétkék színreakciót adó, nikkellel intenzifikált DAB reakciót alkalmaztunk.

3. 1. 3. Primer afferensek jelölése felnőtt patkány gerincvelőben

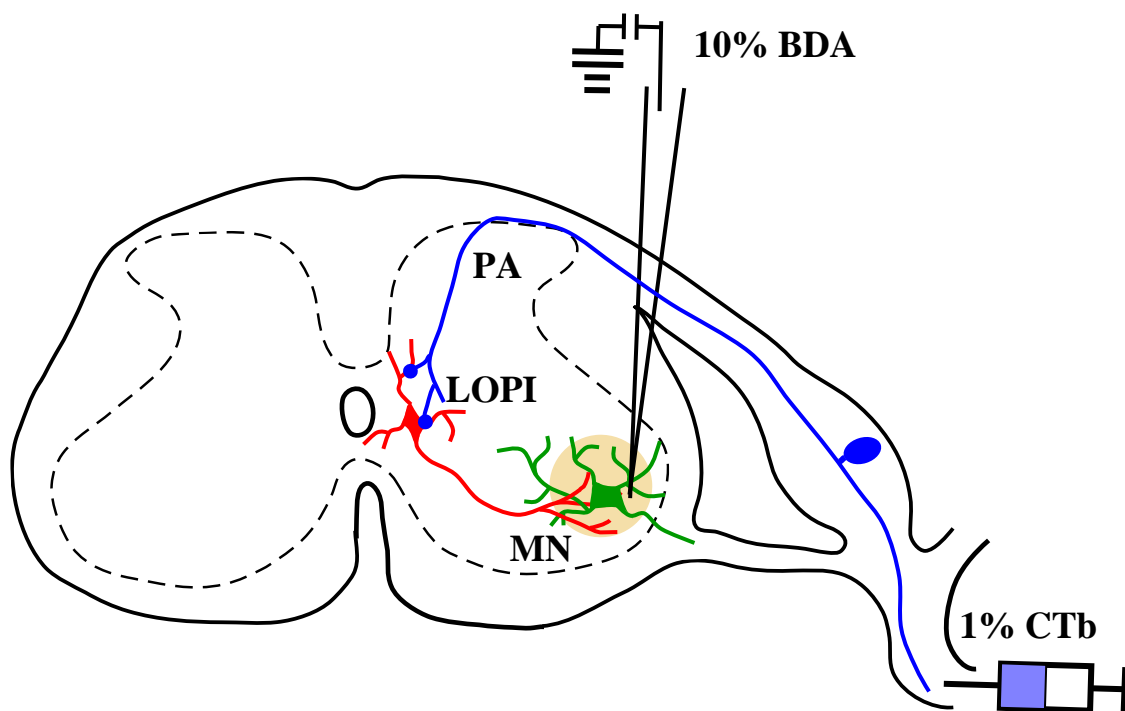
A primer afferens terminálisok utolsó-rendű premotor interneuronokkal kialakított kapcsolatainak vizsgálatához az axonokat kétféle technikával jelöltük:

- 1.) A LOPI-ok Neurobiotinnal történt jelölése után az injekció szintjében az azonos oldali hátsó gyökeret átvágtuk és 10%-os tormaperoxidáz (HRP, Sigma, St. Louis, MO, USA) oldatba helyeztük (**11.a ábra**). A HRP-vel jelölt axonok láthatóvá tételéhez a metszeteket sötétkéék színreakciót adó, nikkellel intenzifikált 0,05% -os DAB oldattal inkubáltuk.



11.a ábra: Utolsó rendű premotor interneuronok (LOPI) és primer afferensek (PA) kapcsolatainak vizsgálata. MN: motoneuron, HRP: tormaperoxidáz.

- 2.) A LOPI-ok BDA-val való jelölése után Cholera toxin (CTb, List Biological, Campbell, CA, USA) 1%-os oldatát injektáltuk nyomással átvágtott nervus ischiadicus centrális csomójába (**11.b ábra**).



11.b ábra: Utolsó-rendű premotor interneuronok (LOPI) és primer afferensek (PA) kapcsolatainak vizsgálata. MN: motoneuron, BDA: biotinilált dextrán amin, CTb: cholera toxin

A CTb-vel jelölt metszeteket 50 percen át 20%-os normál kecske szérumot (NGS, Vector Labs) tartalmazó TPBS-ben inkubáltuk, amellyel blokkoltuk az antitestet aspecifikusan megkötő helyeket. A CTb kimutatása immunhisztokémiai technikával történt, amelyben primer antitestként nyúlban termeltetett poliklonális anti-CTb-t használtunk (1:10000, List Biological) 0,01 M TPBS-ben oldva. A kétnapos primer szérummal történt inkubálást követően kecskében termeltetett biotinilált nyúl ellenes IgG-vel (b-GAR, 1:200, Vector Labs) reagáltattuk a metszeteket 1 éjszakán át. Ezt követően a GAR-hoz kapcsolt biotinhoz ABC-t kötöttünk, amit barna színt adó, DAB kromogén reakcióval tettünk láthatóvá. Az antitesteket és az ABC komplexeket tartalmazó oldatok minden esetben 1%-os NGS-t és 0,1%-os Triton X-100-at is tartalmaztak.

3. 1. 4. A gerincvelő szövettani feldolgozása

Neurobiotin jelölés alkalmazásakor 2 nap, BDA jelölés esetén 7 nap túlélési idő után az állatokat elaltattuk, majd transcardialisan oxigenizált Tyrode oldattal (összetétele:

130 mM NaCl, 24 mM NaHCO₃, 3,5 mM KCl, 1,25 mM NaH₂PO₄, 1mM CaCl₂, 3 mM MgSO₄ és 10 mM glükóz) perfundáltuk. Ezt követően 2,5% glutáraldehidet, 0,5% paraformaldehidet és 0,2% pikrinsavat tartalmazó 0,1 M-os foszfát puffer (pH 7,4) keverékével transcardialisan fixáltuk az állatot, majd a gerincvelő alsó thoracalis és lumbalis szakaszát eltávolítottuk, és két órán át a perfúzióánál használt fixáló oldatban tartottuk. Folyékony nitrogénnel történt fagyasztást követően a blokkokat 5-7%-os agarba ágyaztuk, majd vibrotómmal 60 µm vastag keresztmetszeteket készítettünk. A gerincvelői metszeteken a jelölt LOPI-ok és primer afferensek feltüntetésére a 3. 1. 2. és 3. 1. 3. fejezetekben ismertetett hisztokémiai módszereket alkalmaztuk. A fénymikroszkópos vizsgálatokhoz a metszeteket zselatinózott tárgylemezre helyeztük, majd víztelenítés után Permounttal fedtük.

3. 1. 5. Fénymikroszkópos vizsgálatok, a sejtek rekonstrukciója

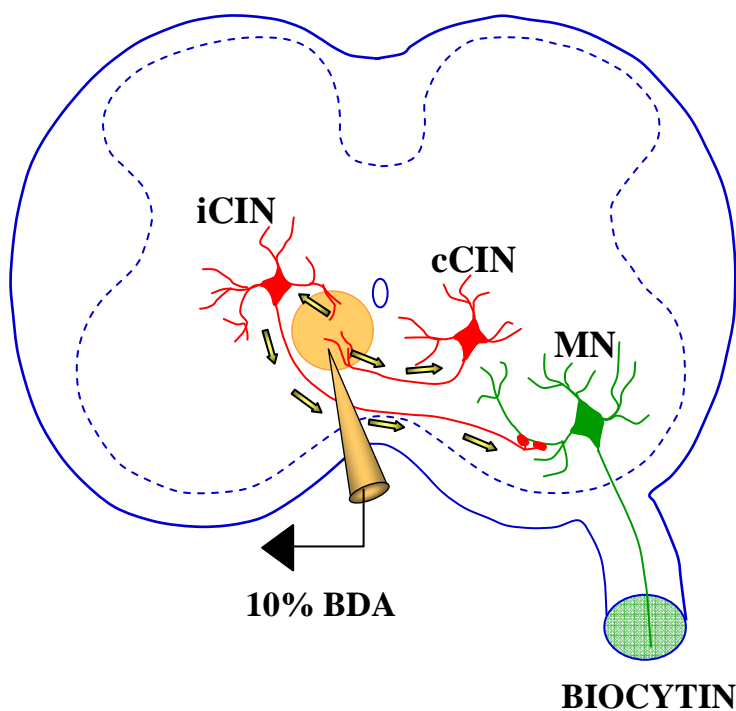
A Neurobiotinnal, illetve BDA-val retrográd módon jelölt premotor interneuronok lamináris és szegmentális megoszlását a gerincvelőből készített sorozatmetszetekből rekonstruáltuk. A gerincvelői metszeteket camera lucida segítségével kirajzoltuk, majd három egymást követő metszetben talált jelölt sejteket egy rajzon összegeztük. Az így készült rajzokat felhasználva a gerincvelői szürkeállomány kontúrját, és a Neurobiotinnal, vagy BDA-val jelölt premotor interneuronokat grafikus táblán keresztül NeuroLucida (MicroBrightfield, Colchester, VT, USA) rekonstrukciós program segítségével számítógépre vittük. A program a rekonstruált egyedi gerincvelői keresztmetszetek összekapcsolásával ábrázolta a jelölt sejtek térbeli eloszlását.

A jelölt utolsó-rendű premotor interneuronok és primer afferens terminálisok közti szoros appozíciók vizsgálata Nikon Eclips 800 mikroszkóppal történt. Kapcsolatként definiáltuk mindazon szoros appozíciókat ahol 100x-os nagyítású olajimmerziós objektív használatával nem láttunk rést a PA axon terminálisok és a LOPI-ok perikarionjai vagy dendritjei között. A jelölt neuronok és PA terminálisok közötti appozíciók fotói SPOT RT CCD (Diagnostic Instruments, Burroughs, MI, USA) kamerával készültek. Az ábrák készítésekor Adobe PhotoShop szoftvert (Adobe Systems, Mountain View, CA, USA) használtunk.

3. 2. COMMISSURALIS INTERNEURONOK (CIN)

3. 2. 1. A sejtek jelölése

Vizsgálatainkat 18 újszülött újszülött (1-8 napos) Wistar patkányból származó *in vitro* gerincvelőn végeztük. Az állatokból a 3. 1. 1. fejezetben leírtak szerint ventralis laminectomia után a gyökereket megtartva a gerincvelőt eltávolítottuk és oxigenizált ACSF oldatot tartalmazó kamrába helyeztük. 15-20 μm hegyátmérőjű üveg mikropipettát biotinizált dextrán amin 10%-os oldatával töltöttünk, majd 5-15 μA erősségű egyenárammal 5-10 percig injektáltunk iontoforetikusan a szürkeállomány ventromedialis (VM) részébe a L2-es és L4-es gerincvelői szegmentumok magasságában. A motoneuronok jelöléséhez az injekcióval ellentétes oldalon a L2-L5-ös ventralis gyökereket úszó parafilmre helyezett biocitin (Sigma, St. Louis, MO, USA) kristályokra fektettük 20 percre (**12. ábra**).



12. ábra: Commissuralis interneuronok (iCIN: ipsilateralis és cCIN: contralateralis commissuralis interneuron) jelölése biotinizált dextrán amin (BDA) injekcióval. Motoneuronok (MN) jelölése ventralis gyökérre helyezett biocitin kristályokkal.

Ezután a gerincvelőt még 4-8 óráig a kamrában tartottuk, majd 2,5% glutáraldehidet, 0,5% paraformaldehidet és 0,2% pikrinsavat vagy 4% paraformaldehidet tartalmazó oldatban fixáltuk.

3. 2. 2. A jelölt CIN-ok és motoneuronok közti kapcsolatok kimutatása

A fixálást követően a lumbalis gerincvelőből vibrotómmal 60 μm vastagságú metszeteket készítettünk. Az úszó metszeteket az alkalmazott szérumok penetrációjának fokozására 50%-os etanol oldatba helyeztük 30 percre, majd az aspecifikus jelölés elkerülésére 10%-os normál ló szérummal (NHS, Vector Labs) blokkoltunk 50 percig. A motoneuronok és a CIN-ok által felvett BDA és biocitin láthatóvá tételéhez a metszeteket 1 éjszakán át 4 $^{\circ}\text{C}$ -on ABC oldatban (ABC, 1:100, Vector Labs) inkubáltuk, majd sötétkék színreakciót adó, nikkellel intenzifikált diamino-benzidin (DAB, SIGMA) reakciót végeztünk. Végül a metszeteket zselatinozott tárgylemezre helyeztük és víztelenítést követően Permounttal fedtük.

A BDA-val retrográd módon jelölt commissuralis interneuronok gerincvelőn belüli megoszlását mikroszkóphoz csatlakoztatott camera lucida segítségével rekonstruáltuk. A gerincvelői metszetekből készült ábrákat grafikus tábla segítségével számítógépbe vittük, majd Neurolucida programmal előállítottuk a gerincvelő és a benne pontszerűen ábrázolt sejtek térbeli eloszlását tartalmazó képet. A CIN-ok dendritfáit camera lucidával 40x-es objektív felhasználásával rekonstruáltuk.

A CIN-ok és MN-ok közötti kapcsolatok fénymikroszkópos azonosítása 100x-os olajimmerziós objektívvel történt Nikon Eclips 800 mikroszkóp alkalmazásával. A fotókat ugyanezen mikroszkóphoz csatlakoztatott SPOT RT CCD kamerával készítettük.

A CIN-ok motoneuronokkal képzett szinapszisait elektronmikroszkópos szinten azonosítottuk. Az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz a metszeteket 0,5%-os osmium-tetroxiddal kezeltük 50 percig, majd alkoholos és propilén-oxidban történt dehidráltást követően Durkupan ACM (Fluka) műgyantába ágyasztuk. A műgyanta teljes polimerizációjáig az anyagot 56 $^{\circ}\text{C}$ -on termosztátban tartottuk, majd a metszetekből a fénymikroszkópos szinten azonosított kapcsolatokat tartalmazó területeket kivágtuk és újraágyasztuk. Ultramikrotómmal 60 nm vastagságú sorozatmetszeteket készítettünk, melyeket formvar hárttyával fedett nikkellel „slot” gridekre helyeztünk. Desztillált vizes mosásokat követően először uranil-acetáttal (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA,

USA), majd újabb mosást követően ólom-citráttal (Reanal, Budapest) kontrasztoltunk. Az elektronmikroszkópos vizsgálatok JEOL 1010 elektronmikroszkóppal történtek.

3. 2. 4. A jelölt CIN axon terminálisok transzmittereinek azonosítása

A CIN-ok neurotranszmittereinek kimutatására fluorescens festékekkel történő kettős és hármas jelöléseket használtunk újszülött (5-8 napos) patkány gerincvelőn. A BDA-val jelölt axon terminálisok serkentő karakterének vizsgálatára a metszeteket 1 éjszakára szobahőmérsékleten tengerimalacban termeltetett vezikuláris glutamát transzporterek elleni antitesteket tartalmazó (VGLUT1, VGLUT2; 1:5000, Chemicon, Temecula, CA, USA) 0,1 M-os PB oldatba helyeztük. Szekunder szérumként Alexa Fluor 546-tal konjugált kecskében termeltetett tengerimalac ellenes antitestet (GAG_P-Alexa 546, 1:1000, Molecular Probes) alkalmaztunk 0,1 M-os PB oldatban. A gátló CIN axon terminálisok azonosításához a metszeteket nyúlban termeltetett glutaminsav-dekarboxiláz (GAD65/67, 1:10000, Sigma) és birkában termeltetett glicin transzporter (GLYT2, 1:5000, Chemicon) ellenes antitesteket egyaránt tartalmazó 0,1 M-os PBS oldatban inkubáltuk. A primer antitesteket ebben az esetben is fluoreszcens festékekkel kapcsolt szekunder antitestekkel tettük láthatóvá: a GABA kimutatására a GAD65/67-hez Alexa Fluor 647-tel konjugált számrban termeltetett nyúl ellenes antitestet (DAR-Alexa 647) kapcsoltunk, míg a terminálisok glicin tartalmát GLYT2-höz kapcsolódó Alexa Fluor 546-tal konjugált számrban termeltetett birka ellenes antitesttel (DAS-Alexa 546, mindkettő 1:1000, Molecular Probes) mutattuk ki. Végül a metszeteket tárgylemezre helyeztük és Vectashielddel (Vector Labs) fedtük. Az immunfestés specificitását primer antitesteket nem tartalmazó normál lo szérummal (NHS) való inkubálással teszteltük.

A jelölt CIN axon terminálisokat tartalmazó lumbalis gerincvelő ventralis szürkeállományának 0,5 µm vastagságú optikai szeleteit 60x-os olajimmerziós objektívvel Zeiss LSM 510 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk. A rendszer egyszerre három hullámhosszon képes gerjeszteni a fluorescens festékeket, így a CIN terminálisok neurotranszmittereit a következő módon határoztuk meg:

- 1.) A glutamátot tartalmazó terminálisok azonosításához a 488 nm hullámhosszon jelet adó BDA-val jelölt összes terminálisból ugyanazon mikroszkópi látótérben kiválasztottuk az 568 nm hullámhosszú lézerrel gerjesztett VGLUT1,2 tartalmú terminálisokat. Megszámoltuk a kijelölt területen található BDA-val jelölt CIN axon terminálisokat, majd megnéztük, hogy ezek közül, melyek mutatnak VGLUT1,2

transzmitter specifikus immunoreaktivitást is, azaz tűnnek fel sárga színben az egymásra vetített felvételeken.

- 2.) A CIN-ok gátló neurotranszmitter tartalmának vizsgálatához a BDA-val jelölt terminálisok közül a GAD65/67 tartalmúakat 647 nm-es, míg a GLYT2-t tartalmazókat 555 nm-es hullámhosszúságú lézerrel gerjesztettük. Az egy látótérben lévő terminálisokat különböző hullámhosszúságú lézerrel vizsgálva lehetőségessé vált egy adott CIN terminális GABA és glicin tartalmának, illetve a két gátló transzmitter együttes előfordulásának vizsgálata is.

Az állatkísérletek végzéséhez az adott időszakban érvényes egyetemi engedéllyel (eng. szám: 40/ 1996/ ATEB és 19/2001 DE MÁB) rendelkezünk.

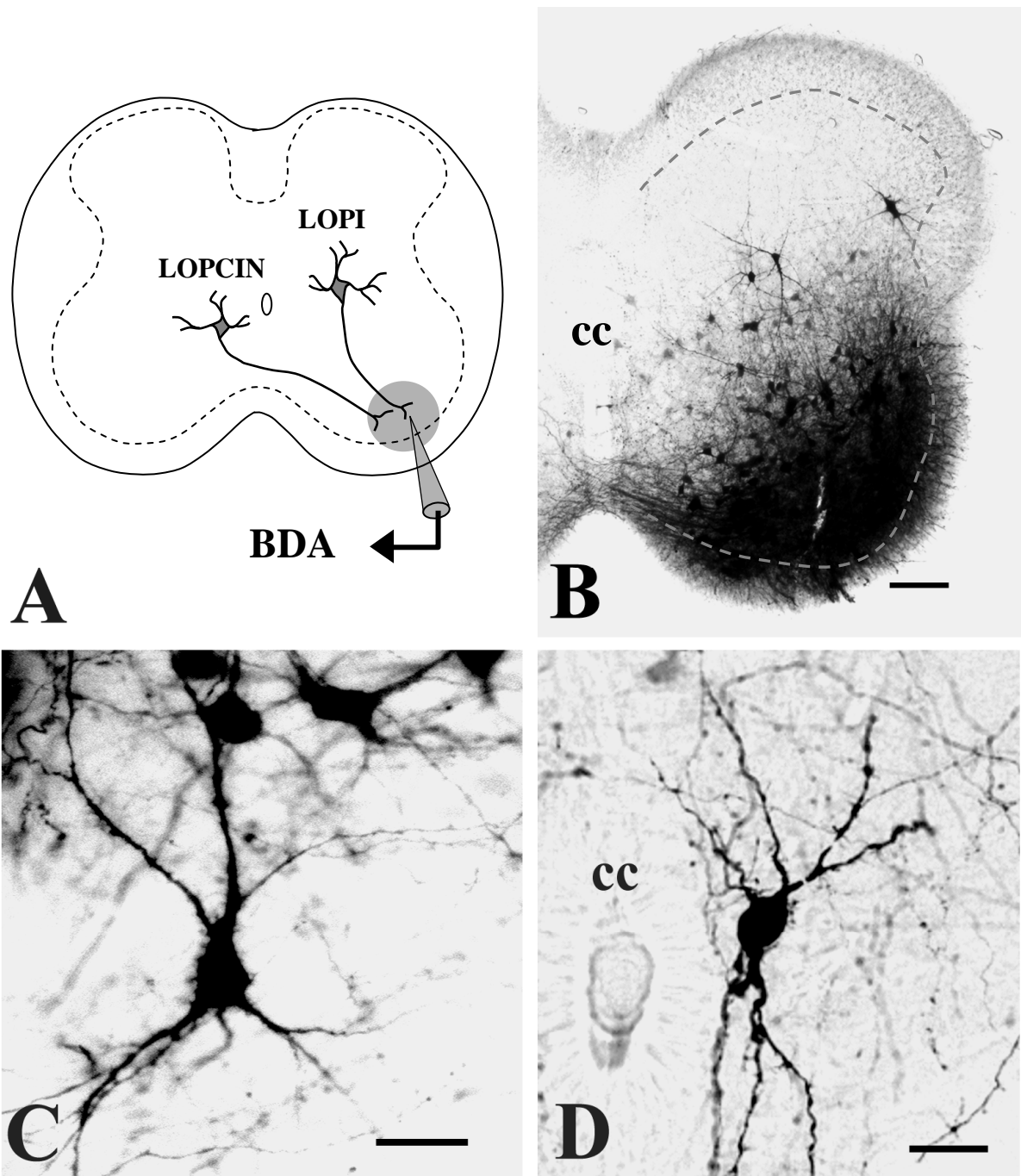
4. EREDMÉNYEK

4. 1. Utolsó rendű premotor interneuronok kapcsolatai primer afferensekkel

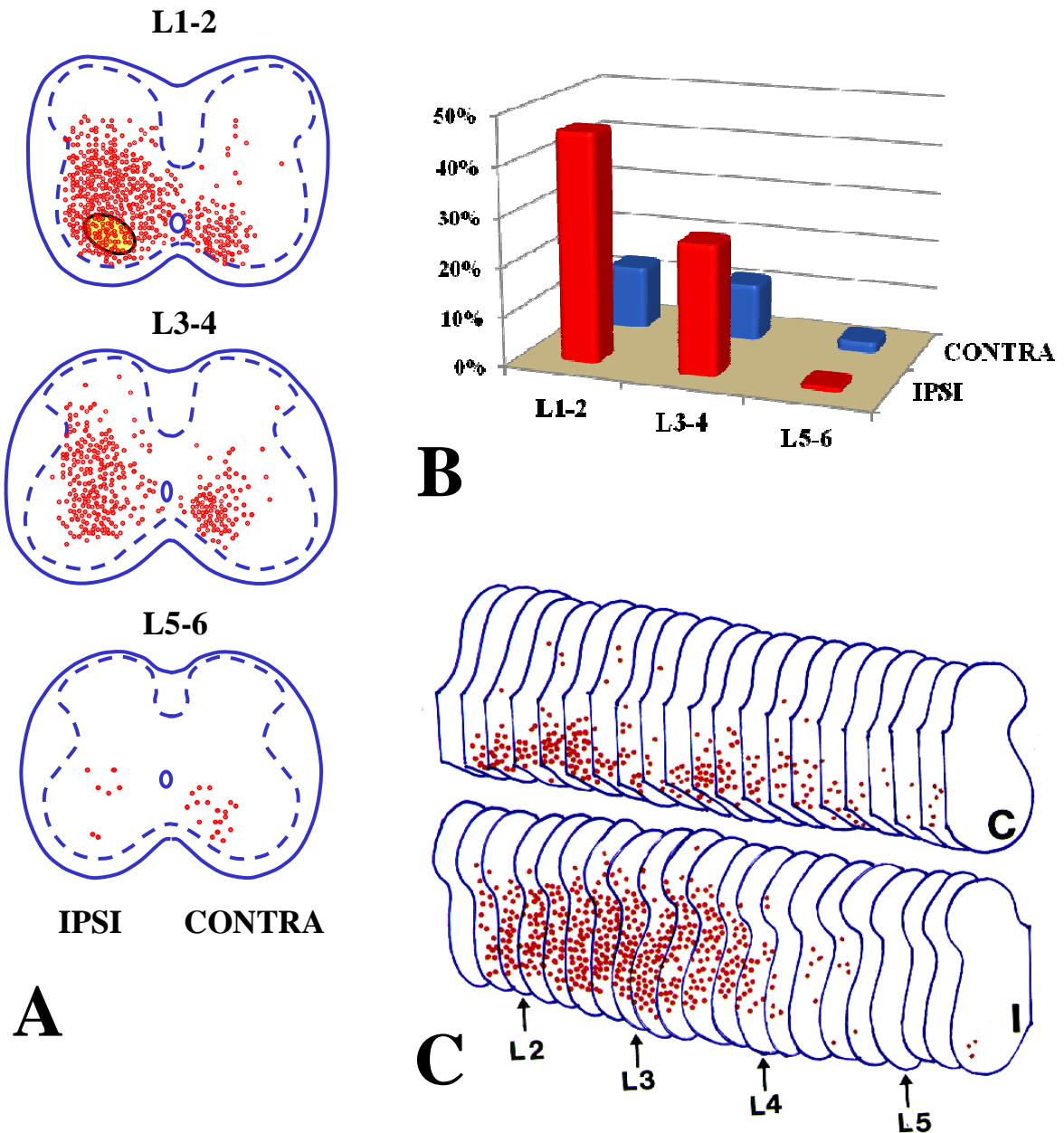
4. 1. 1. Utolsó rendű premotor interneuronok jelölése újszülött patkány gerincvelőben

A motoneuronokhoz közvetlenül kapcsolódó premotor interneuronok retrográd jelöléséhez BDA-t injektáltunk iontoforetikusan a lateralis motoros oszlopba a L2-es és L4-es gerincvelői szegmentumok magasságában (**13. A ábra**). A mikropipetta hegye körül kis nekrotikus centrum keletkezett, melyet diffúzan festődött terület vett körül. A nekrotikus és a diffúzan festődött területet tekintettük az injekciós helynek, melynek kiterjedése mind horizontálisan, mind rostrocaudalisan 100-150 μm volt (**13. B ábra**). Az injekciót követően a gerincvelő mindkét oldalán nagy számban találtunk jelölődött interneuronokat a lumbalis gerincvelői szürkeállomány területén. Ezen neuronok többsége intenzív homogén festődést mutatott, mely a szómát és a dendritfa nagy részét is feltüntette (**13. C, D ábra**). Kísérleteinket öt állaton végeztük, az injekciós terület nem megfelelő elhelyezkedése miatt 2 állatot kizártunk a végső értékelésből, így az itt szereplő adatok 3 állatból származnak.

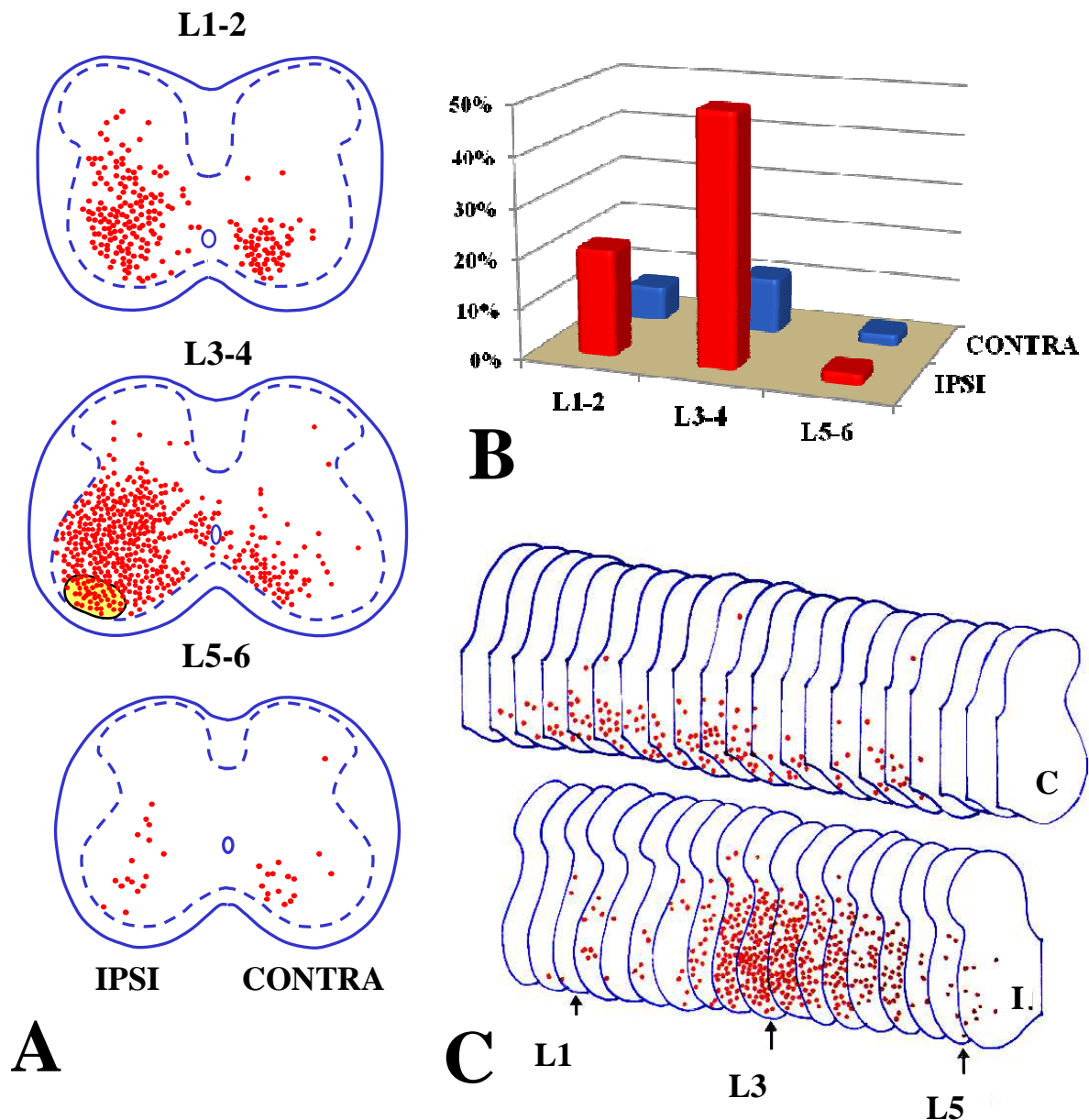
Mind a L2-es, mind a L4-es szegmentumok magasságában való jelölést követően a sejtek többsége az injekcióval azonos oldalon helyezkedett el (83% és 82%), de jelentős számban találtunk jelölt sejteket contralateralisan is (17% és 18%). Az ipsilateralis premotor interneuronok (LOPI) a gerincvelői szürkeállomány ventromedialis részén koncentráálódtak, elsősorban az V-VIII-as laminák medialis területén (**14. A és 15. A ábra**). A contralateralisan jelölődött commissuralis premotor interneuronok (LOPCIN) többségét a VIII-as lamina területén találtuk, de voltak sejtek a VII-es és X-es laminák medialis részén is. A rostrocaudalis eloszlást vizsgálva azt találtuk, hogy mind a L2-es mind a L4-es szegmentumokba történt injekció után is a legtöbb sejt az injekciós hely szegmentumában helyezkedett el a szürkeállomány mindkét oldalán (**14. B, C és 15. B, C ábra**). Mindkét injekció alkalmazása után a jelölt sejtek döntő többségét a lumbalis 1-4-es szegmentumokban találtuk, míg a lumbalis 5-6-os szegmentumok viszonylag kevés LOPI-t tartalmaztak (**14. és 15. ábra**).



13. ábra: Utolsó rendű premotor interneuronok (LOPI) jelölése a lateralis motoros oszlopba adott BDA injekcióval. A: Az injekció sematikus ábrázolása. A szürkére festett terület az injekciós helyet jelöli. B: Az injekciós hely fényképe. A szaggatott vonal az A és B ábrán is a szürke és fehérállomány határát jelöli. C és D: Két utolsó rendű premotor commissuralis interneuron fényképe. LOPCIN: utolsó rendű premotor commissuralis interneuron, BDA: biotinilált dextrán amin, cc: canalis centralis. Kalibrációs egyenesek: 100 μm a B, 25 μm a C és D ábrákon.



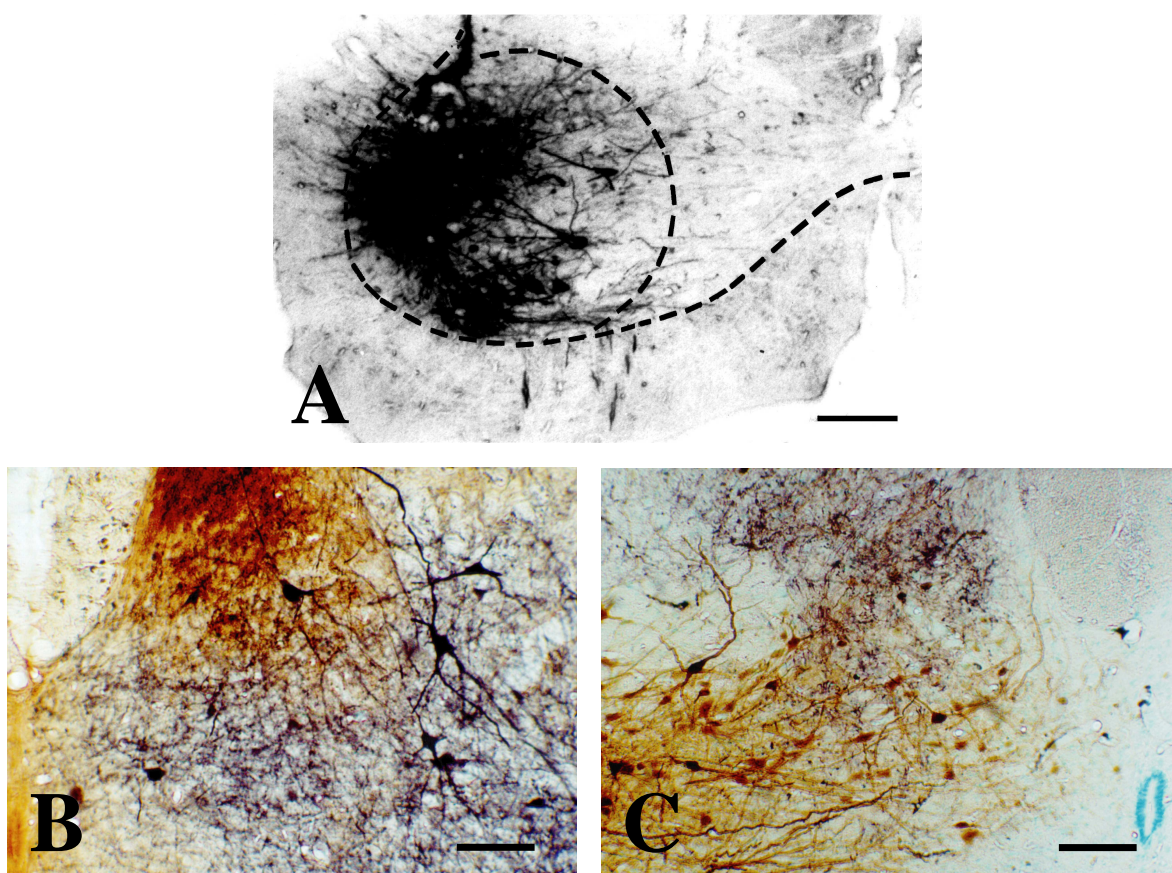
14. ábra: A jelölt premotor interneuronok eloszlása, a L2-es szegmentum magasságában a lateralis motoros oszlopba történt BDA injekció után. **A:** A lumbalis gerincvelői szegmentek camera lucida rajzai, melyekben a jelölt sejtek eloszlása látható. A sárgára színezett terület az injekciós helyet jelöli. **B:** A diagram a sejtek eloszlását mutatja az injekcióhoz képest ipsilateralisan (IPSI) és contralateralisan (CONTRA). Az oszlopok magassága az adott szegmentumban lévő sejtek százalékos arányát mutatja, az adott oldalon jelölt összes sejthez képest. **C:** A lumbalis gerincvelői szürkeállomány ipsi- (I) és contralateralis (C) oldalának háromdimenziós rekonstrukciós képe. Az A és C ábrákon minden pont egy neuronnak felel meg.



15. ábra: A jelölt neuronok eloszlása, a L4-es szegmentum magasságában a lateralis motoros oszlopba történt BDA injekció után. **A:** A lumbalis gerincvelői szegmentek camera lucida rajzai, melyekben a jelölt sejtek eloszlása látható. A sárgára színezett terület az injekciós helyet jelöli. **B:** A diagram a sejtek eloszlását mutatja az injekcióhoz képest ipsilateralisan (**IPSI**) és contralateralisan (**CONTRA**). Az oszlopok magassága az adott szegmentumban lévő sejtek százalékos arányát mutatja az adott oldalon jelölt összes sejthez képest. **C:** A lumbalis gerincvelői szürkeállomány ipsi- (**I.**) és contralateralis (**C**) oldalának háromdimenziós rekonstrukciós képe. Az **A** és **C** ábrákon minden pont egy neuront jelöl.

1. 2. Utolsó rendű premotor interneuronok jelölése felnőtt patkány gerincvelőben

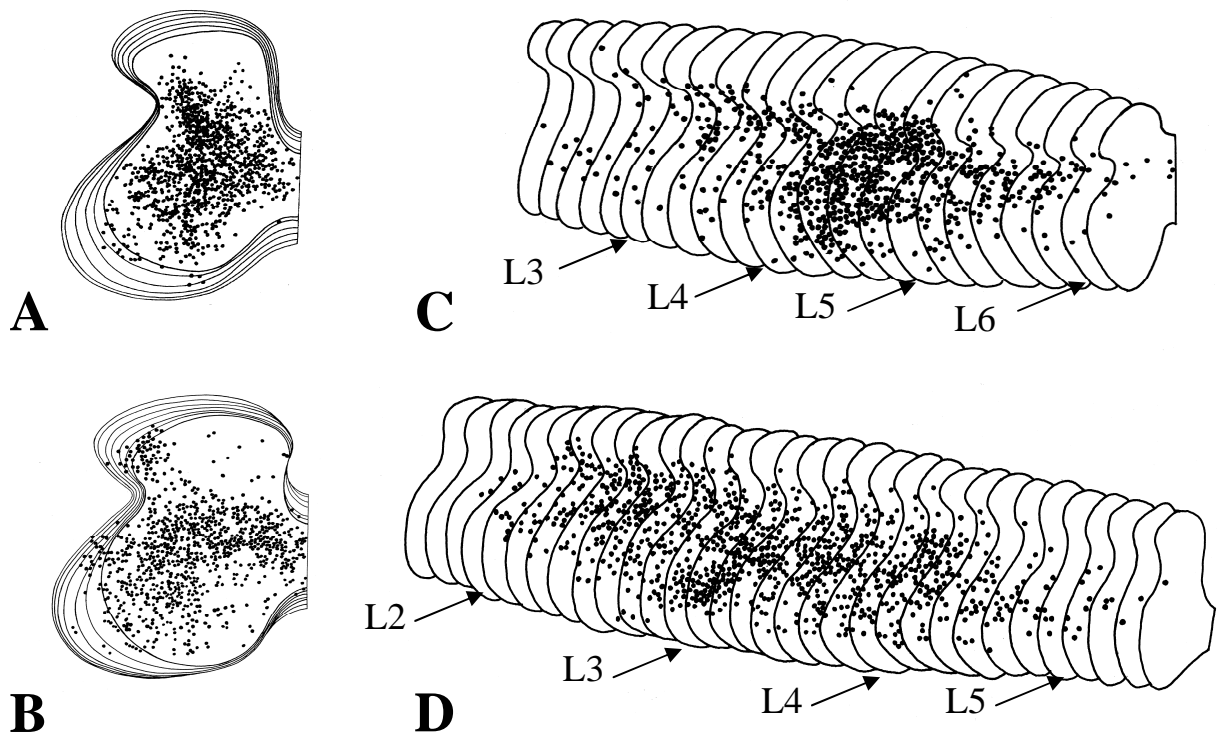
Mind a Neurobiotin, mind a BDA iontoforetikus injekciója a lumbalis 3-5 szegmentumok magasságában, jól körülhatárolt (300-400 μm átmérőjű) injekciós helyet eredményezett a lateralis motoros oszlop területén (**16. A ábra**).



16. ábra: Utolsó rendű premotor interneuronok (LOPI) és primer afferensek (PA) jelölése.
A: BDA injekció a lateralis motoros oszlopba. **B:** BDA-val jelölt interneuronok (acélkék) és CTb-vel jelölt primer afferensek (barna) a gerincvelő ventromedialis területén. **C:** Neurobiotinnal jelölt interneuronok (barna) és HRP-vel jelölt primer afferensek (acélkék) a gerincvelő ventromedialis területén. Kalibrációs egyenesek: 200 μm az **A**, 100 μm a **B** és **C** ábrán.

A nem megfelelő injekciós hely következtében 9 állatot kizártunk a további vizsgálatokból, így az itt szereplő adatok 5 állatból származnak. Az injekciókat követően nagyszámú retrográdan jelölődött LOPI-t találtunk a gerincvelőben. A 20-50 μm átmérőjű

szómákból 2-5 dendrit eredt, melyek többszörösen elágaztak, és akár 300-400 μm távolságban is követhetőek voltak a szürkeállomány területén. A jelölt sejtek és dendritek nagy száma miatt az egyedi neuronok dendritfájának sorozatmetszetekből való rekonstrukciója nem volt lehetséges. (16. B, C ábra).



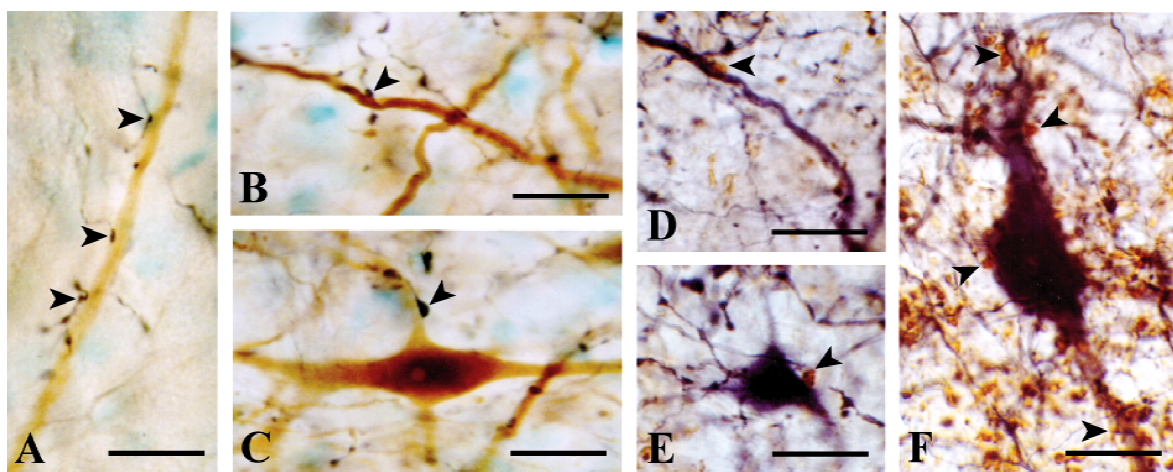
17. ábra: Utolsó rendű premotor interneuronok eloszlása a lumbalis gerincvelőben. Az ábrákon a Neurobiotinnal (A és C) és BDA-val (B és D) jelölt utolsó rendű premotor interneuronok eloszlása látható a lumbalis gerincvelő szürkeállományában. Az ábrákon a gerincvelő szürkeállományának kontúrja látható, melyben minden pont egy jelölt sejtnek felel meg. Az oldalnézeti képeken (C és D) a nyilak a ventralis gyökerek kilépési helyeit mutatják.

Habár az egyes kísérletekben a jelölt sejtek száma jelentős variabilitást mutatott, azok többsége minden esetben az injekcióval azonos oldalon helyezkedett el, s csak 2-6%-uk volt a contralateralis szürkeállományban. Kevés kivételtől eltekintve a jelölt neuronok számái az V-VII-es laminákban jelölődtek (17. A, B ábra). A gerincvelői

sorozatmetszetek 3-dimenziós rekonstrukciója azt mutatta, hogy mind a Neurobiotin, mind a BDA lateralis motoros oszlopba adott injekciója után a gerincvelő 3-4 szegmenyum hosszúságú szakaszán jelölődtek interneuronok, legnagyobb denzitással a jelölőanyagok alkalmazásának helyén (17. C, D ábra).

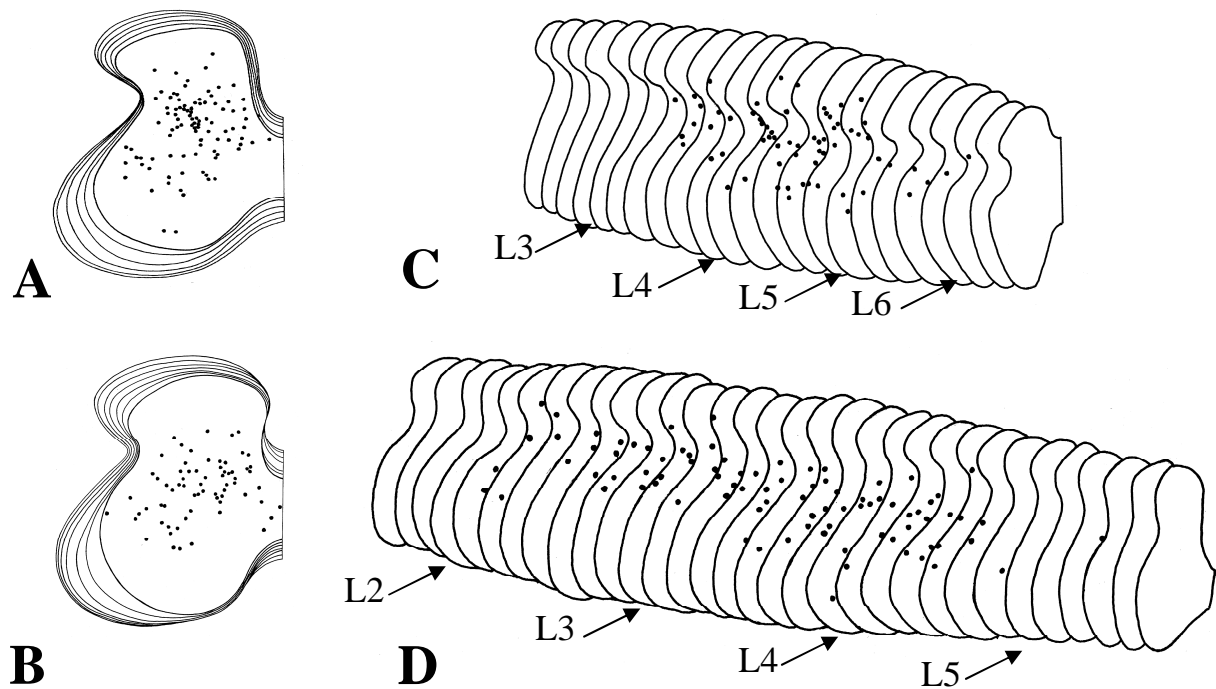
4. 1. 3. Primer afferensek LOPI-okkal kialakított szinaptikus kapcsolatai

A hátsó gyökér HRP-vel való töltése és a n. ischiadicusba adott CTb injekció is a primer afferensek intenzív jelölődését eredményezte (16. B, C ábra). Mindkét módszer alkalmazása után nagyszámú primer afferens terminálist találtunk a jelölődött interneuronokat tartalmazó V-VII-es laminák területén, ami lehetővé tette a PA terminálisok és a Neurobiotinnal vagy BDA-val jelölt LOPI-ok szómái és dendritjei közti szoros appozíciók vizsgálatát (18. ábra).



18. ábra: Primer afferensek utolsó rendű premotor interneuronokkal kialakított kapcsolatai.

Az A, B és C jelű fotókon a Neurobiotinnal jelölt utolsó rendű premotor interneuronok barna színűek, míg a HRP-vel jelölt primer afferens terminálisok acélkékek. A D, E és F-jelű fotókon a BDA-val jelölt interneuronok acélkékek, a CTb-vel jelölt primer afferens axon terminálisok pedig barna színűek. A nyílhegyek a primer afferens terminálisoknak a retrográd módon jelölt interneuronok dendritjeivel, és szómáival képzett szoros appozícióira mutatnak. Kalibráció: 20 μ m.



19. ábra: Primer afferensektől kontaktust fogadó utolsó rendű premotor interneuronok.

A *NeuroLucida* program segítségével készült ábrákon a Neurobiotinnal (A és C) és BDA-val (B és D) jelölt utolsó rendű premotor interneuronok (17. ábra) közül azok láthatóak, amelyek a primer afferens axon terminálisoktól kontaktus fogadtak. A lumbalis gerincvelői szürkeállomány kontúrján belül minden pont egy jelölt sejtnek felel meg. Az oldalnézeti képeken (C és D) a nyilak a ventralis gyökerek kilépési helyeit mutatják.

A primer afferensek projekcióinak vizsgálatakor megszámoltuk azokat a jelölődött utolsó rendű premotor interneuronokat és izolált dendrit szegmentumjaikat, amelyek terminálisokat fogadtak a jelölt primer afferensek felől. A metszetek alapos analízise azt mutatta, hogy az összes jelölt interneuronnak (17. ábra) csak a töredéke (2,5-9,2%-a) fogadott valószínűsíthető kapcsolatot primer afferens axon terminálisoktól (19. ábra, 1. táblázat), s ezen sejtek is csupán néhány kontaktust (1-5) fogadtak (18. ábra). Csak néhány olyan neuront találtunk, amellyel nagyobb számú terminális alakított ki szoros appozíciót (18. F ábra). Azt, hogy az adott LOPI egy, vagy több primer afferens rosttól fogadott-e kapcsolatot, nem vizsgáltuk. A kontaktust fogadó LOPI-ok az injekciós helyek közelében (azaz az injekció során jelölődött motoneuronokhoz közel) koncentráálódtak, az V-VI-os laminák mediolateralis és a VII lamina dorsalis részén (19. ábra).

1. táblázat: Primer afferens axon terminálisoktól kontaktust fogadó utolsó rendű premotor interneuronok.

Állatok	Jelölt interneuronok száma	Primer afferensektől kontaktust fogadó LOPI-ok száma és aránya	
NB/HRP 4	950	70	(7,4%)
BDA/CTB 1	308	21	(6,8%)
BDA/CTB 2	363	9	(2,5%)
BDA/CTB 4	1043	96	(9,2%)
BDA/CTB 6	640	46	(7,2%)
Összesen	3304	242	(7,3%)

Izolált dendrit szegmentumokon csak ritkán találtunk kontaktust. Azt az esetet, amikor a kontaktust fogadó dendritszakaszt nem lehetett egy adott szómához kötni kétféle módon interpretálhatjuk. Ha ezen dendritdarabok olyan neuronokhoz tartoznak amelyek szómái és/vagy proximális dendritjei is szoros appozíciókat alakítanak ki PA terminálisokkal, a talált kontaktusok nem módosítják a PA-ektől kontaktust fogadó sejtek arányát. Ha viszont az izolált dendriteken talált appozíciók olyan sejtekhez tartoznak, amelyek kizárólag distalisan fogadnak kontaktust, az növelheti a PA-ekkel kapcsolatot létesítő sejtek számát, ill. arányát. Mivel azonban ilyen distalisan elhelyezkedő szoros appozíciót csak rendkívül kis számban találtuk, úgy gondoljuk, hogy ez jelentősen nem befolyásolja kapott eredményeinket.

4. 2. Commissuralis interneuronok szinaptikus kapcsolatai és neurotranszmitterei

4. 2. 1. Commissuralis interneuronok jelölése

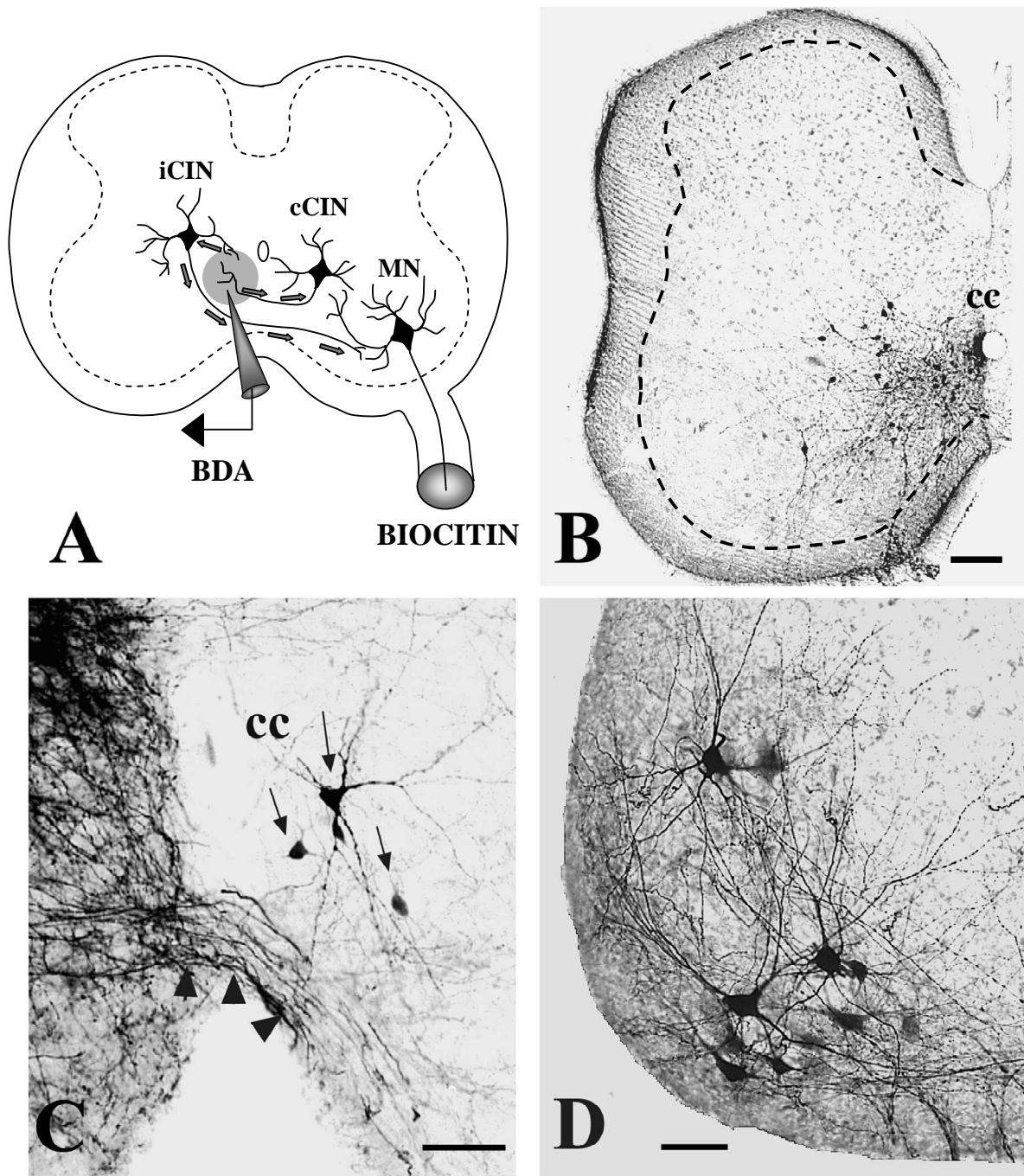
A commissuralis interneuronok feltüntetéséhez BDA-t injektáltunk a L4-es szegmentum magasságában a szürkeállomány ventromedialis területébe (**20. A ábra**). Az 50-150 μm átmérőjű injekciós hely egy központi, kisméretű nekrotikus centrumból és az azt körbevevő diffúzan festődött területből állt (**20. B ábra**). Az injekció közelében található neuronok sejttestükön és dendritjeiken keresztül felvették a jelölőanyagot és az axonba transzportálták (**iCIN, 20. A ábra**). Ezen anterográd módon jelölődött CIN-ok axonjai a ventralis commissurában keresztelték a középvonalat, és az ellenoldali szürkeállomány területén végződtek. (**20. C ábra**). A CIN-ok egy másik csoportjának axonjai (**cCIN, 20. A ábra**) az injekciós területben értek véget. Ezek a sejtek az axon terminálisaikon keresztül vették fel a BDA-t, s azt retrográd módon a szómába és a dendritekbe szállították (**20. C ábra**).

Az injekció után a motoneuronok jelölésére az injekcióval ellenoldali ventralis gyökereket a L2-L5-ös szegmentumok magasságában biocitinnel töltöttük (**20. A ábra**). A motoneuronok axonjaikon keresztül felvették a biocitint, ami retrográd transzporttal eljutott a sejttestbe, valamint a dendritfa jelentős részét is megfestette. (**20. D ábra**).

Kísérleteinket 18 állaton végeztük. Az injekció nem megfelelő elhelyezkedése, illetve az elégtelen motoneuron jelölődés miatt 11 állatot kizártunk a végső értékelésből, így a dolgozatban szereplő adatok hét állatból származnak.

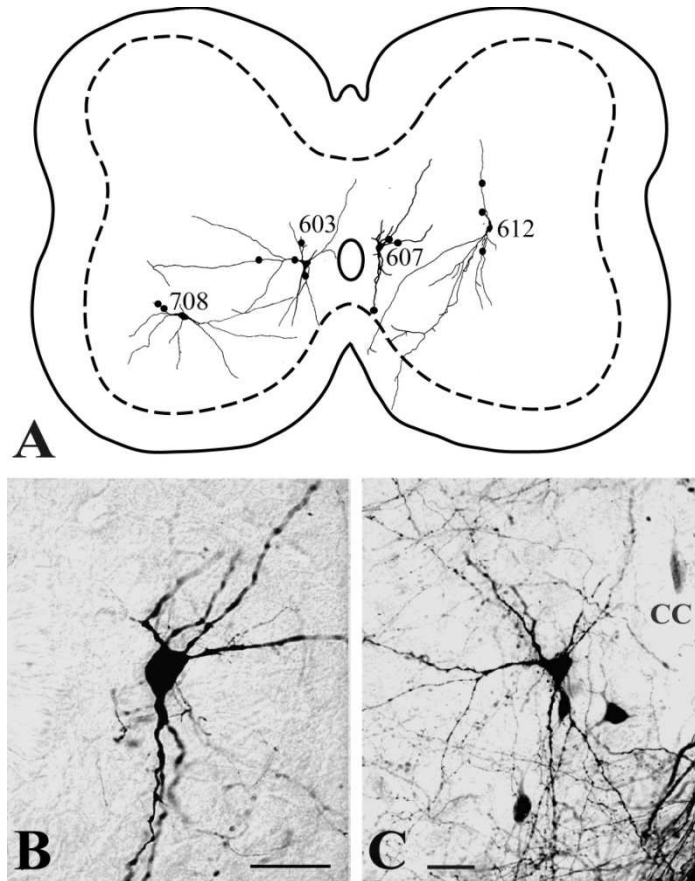
4. 2. 2. Commissuralis interneuronok morfológiája

Bár a CIN-ok morfológiája igen változatos, méretük, a sejttest alakja és a dendritarborizáció fő irányai alapján két fő csoportba lehetett őket sorolni. Az egyik csoportba azok a neuronok kerültek, amelyek piramis alakú 10-20 μm átmérőjű szómája a VII-es lamina medialis részében volt. A sejttestből a tér minden irányába eredtek dendritek (**21. A ábra, 603-as számú sejt, és 21. C ábra, ugyanezen sejt fotója**). A nagyobb csoportot olyan, poligonális szómával rendelkező sejtek alkották (**21. A ábra, 607-es jelű sejt, és 21. B ábra, ugyanezen sejt fotója**), melyek a szürkeállomány ventromedialis területének medialis részén helyezkedtek el, közvetlenül a canalis centralis mellett.



20. ábra: CIN-ok jelölése a gerincvelő szürkeállományának ventromedialis területébe adott BDA injekcióval és a motoneuronok szimultán jelölése biocitinnel. **A:** Az injekció sematikus ábrázolása. A szürkére festett terület az injekciós helyet jelöli. **B:** Az injekciós hely fényképe. A szaggatott vonal az **A** és **B** ábrán is a szürke- és fehérállomány határát jelöli. **C:** Retrográd módon jelölt commissuralis interneuronokról (nyilak) és a középvonalat keresztező anterográd módon jelölt CIN axonokról (nyílhegyek) készült fénykép. **D:** Biocitinnel jelölt motoneuronokról készült fénykép. **iCIN:** ipsilateralis commissuralis interneuron, **cCIN:** contralateralis commissuralis interneuron, **MN:** motoneuron, **cc:** canalis centralis. Kalibrációs egyenesek: 100 μm a **B**, 50 μm a **C** és **D** ábrákon.

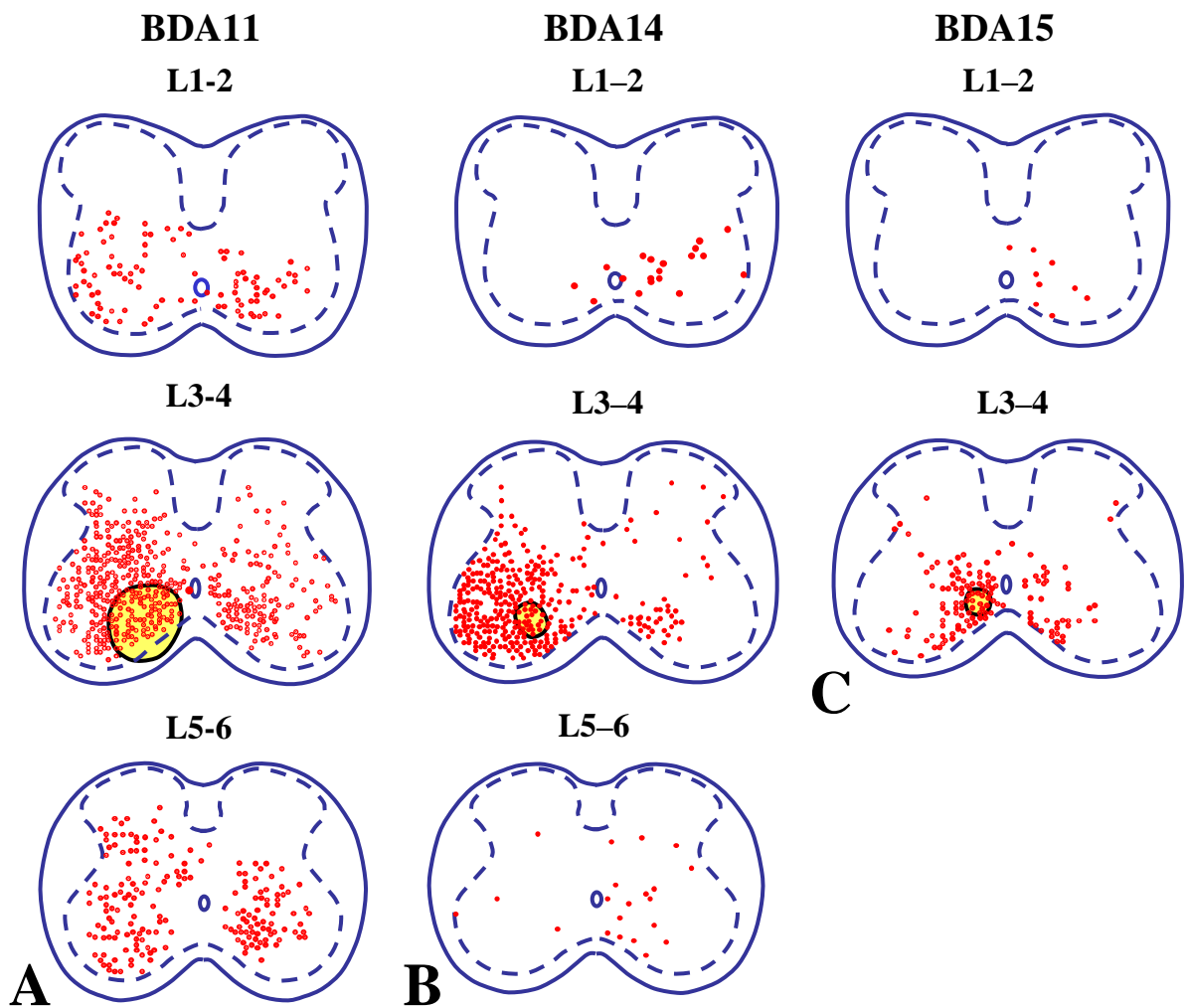
Sejttestük 15-30 μm átmérőjű volt, amiből 2-5 hosszú, elágazó, dorsoventralis irányultságú dendritfa eredt.



21. ábra: A commissuralis interneuronok morfológiája. A: *Ventromedialis BDA injekciót követően retrográdan jelölődött commissuralis interneuronok camera lucida rajzai sémás gerincvelői ábrába helyezve.* B és C: *Különböző morfológiájú CIN-ok fényképei. A B-jelű képen a 607-es, a C- jelűn a 603-as számú sejt fényképe látható. cc: canalis centralis. Kalibrációs egyenesek: 25 μm .*

4. 2. 3. Commissuralis interneuronok eloszlása a gerincvelőben

Kísérleteinkben az injekció méretétől és pontos elhelyezkedésétől függően a jelölt sejtek száma jelentősen eltért egymástól, többségük azonban mindig az injekció szegmentumában helyezkedett el, de 1-2 szegmentummal rostralisabban és caudalisabban is voltak jelölt neuronok (**22. ábra**).

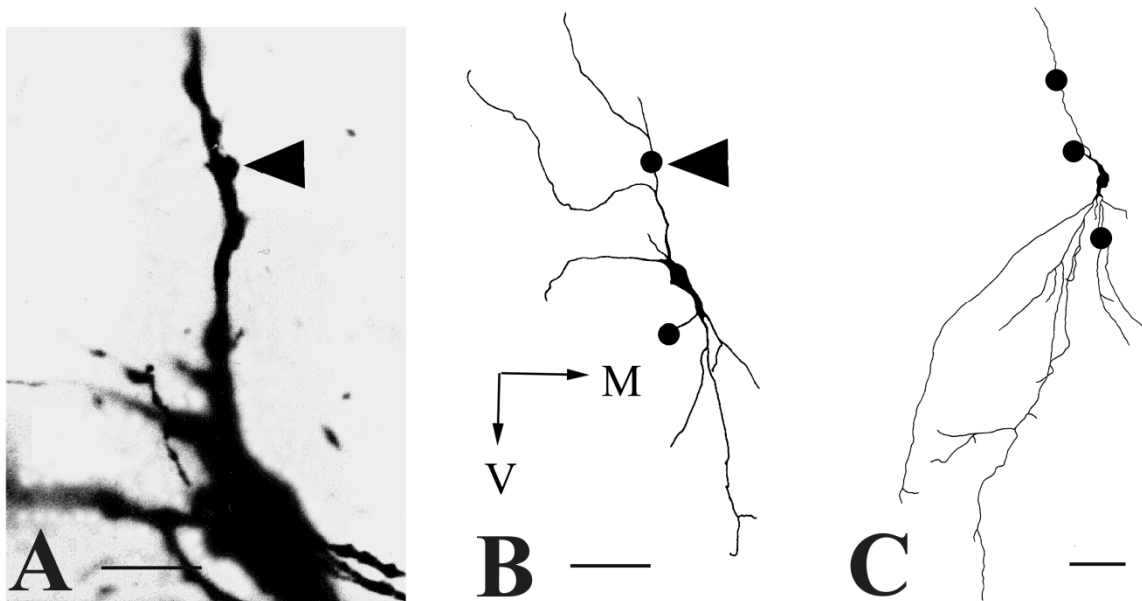


22. ábra: A jelölt neuronok eloszlása, a L4-es szegmentum magasságában a gerincvelői szürkeállomány ventromedialis területébe történt BDA injekció után. A, B, C: A gerincvelői szegmentumok camera lucida rajzai, melyekben a jelölt sejtek eloszlása látható. A sárgára színezett terület az injekciós helyet jelöli. Az ábrákon minden pont egy neuront jelöl.

Figyelmünket elsősorban az injekcióval contralateralisan elhelyezkedő sejtekre fókuszáltuk. Ezek a neuronok axonjaikon keresztül retrográd módon megjelölt commissuralis interneuronok (cCIN) voltak, melyek a gerincvelő szürkeállományának ventromedialis területén (VII-es lamina medialis része, VIII-as és X-es laminák) koncentráálódtak a vizsgált gerincvelőszakasz teljes hosszában. Minél kisebb volt az injekciós terület nagysága (50-150 μm) - amelyet a mikropipetta hegyátmérője és az alkalmazott áramerősség határozott meg - annál kevesebb cCIN jelölődött, ugyanakkor, nem tapasztaltunk különbséget a jelölődött CIN-ok eloszlásában.

4. 2. 4. Kapcsolat a gerincvelő két oldalán jelölődött commissuralis interneuronok között

Amint azt a 20. C ábrán a ventralis commissurában futó axonköteg bizonyítja, a ventromedialis BDA injekciót követően jelentős számban jelölődtek commissuralis interneuronok ipsilateralisan az injekció oldalán is (iCIN). Ezeknek a sejteknek az axonja a gerincvelő ellenkező oldalára átjutva kapcsolatot képezhetett a contralateralis szürkeállományban jelölődött CIN-okkal (cCIN). A lehetséges kontaktusok azonosításához 35 contralateralisan elhelyezkedő CIN szómáját és dendritfáját vizsgáltuk át fénymikroszkóppal olajimmerziós nagy nagyítású lencsét használva. Összesen 17 sejtet találtunk szinaptikus kapcsolatra utaló szoros összefekvéseket az anterográd módon jelölt iCIN-ok axon terminálisaival (2. táblázat, 23. ábra). A sejtek átlagosan két kapcsolatot fogadtak, amelyek kizárólag a dendritek proximális részén fordultak elő (23. ábra).



23. ábra: A gerincvelő két oldalán jelölődött commissuralis interneuronok (CIN) közötti kapcsolatok. Az anterográd módon jelölt CIN axon terminálisok és a retrográd módon jelölt CIN-ok közötti szoros összefekvésekről készített fénykép (A) és camera lucida rajzok (B, C), melyek poligonális szómával rendelkező CIN-okat ábrázolnak. Az A és a B képen ugyanaz a sejt látható, és a nyílhegyek is ugyanazt a kapcsolatot jelölik. A B és a C képen a szoros appozíciókat a fekete pontok jelölik. A B képen látható nyilak ventralis (V) és medialis (M) irányba mutatnak. Kalibrációs egyenesek: 10 μm az A, 50 μm a B és C képeken.

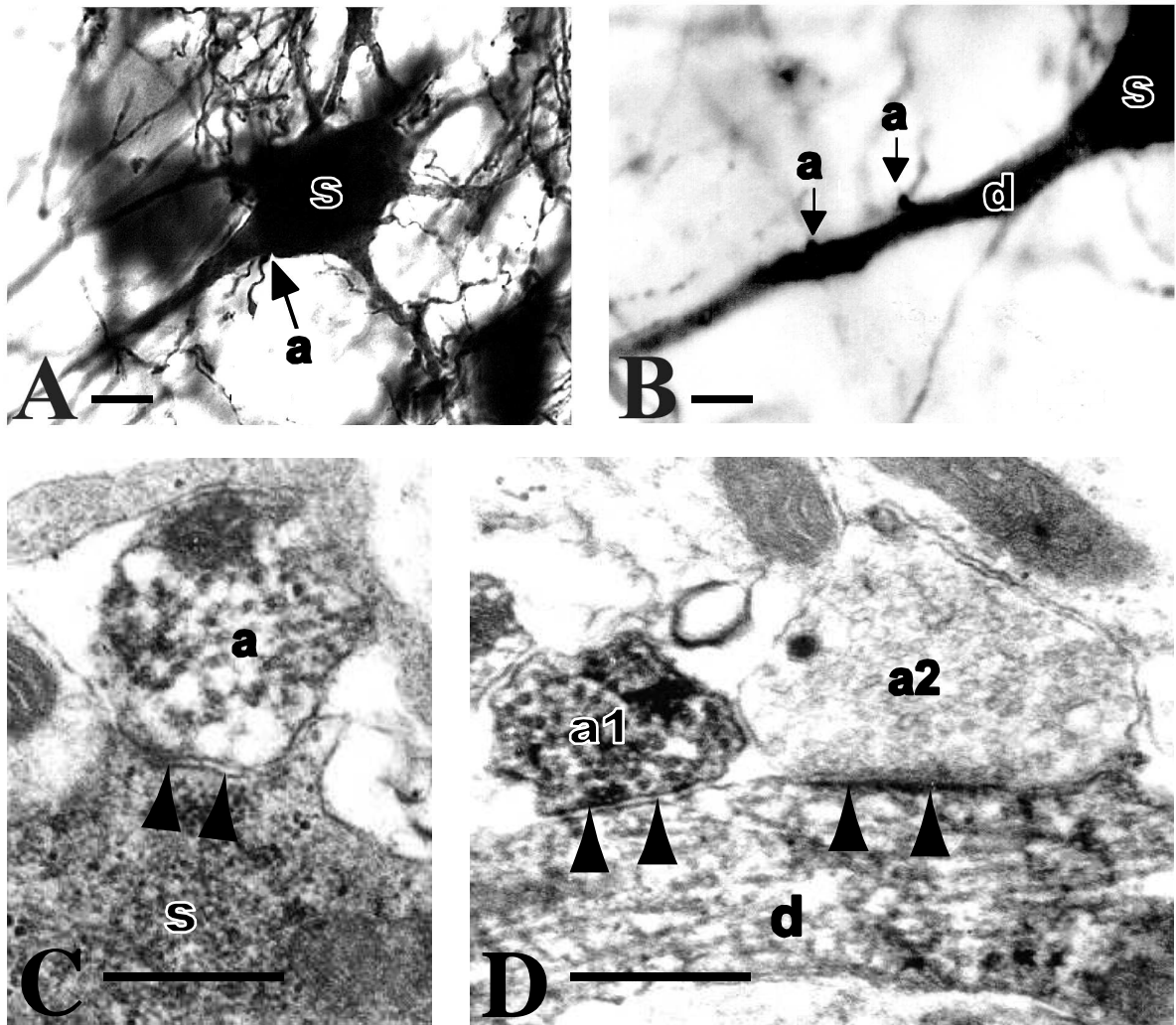
2. táblázat: A gerincvelő két oldalán elhelyezkedő commissuralis interneuronok (CIN) egymással kialakított kapcsolatai.

Állatok	Vizsgált CIN-ok száma	Kapcsolatokat fogadó CIN-ok száma	Kapcsolatok száma
BDA 2	3	2	3
BDA 4	12	5	6
BDA 6	8	4	12
BDA 7	12	6	13
Összesen	35	17	34

4. 2. 5. Commissuralis interneuronok kapcsolatai motoneuronokkal

A ventromedialis injekciót követően az anterográd módon jelölt iCIN-ok axonjai a középvonalat keresztezve és az injekcióval ellenkező oldalon gazdagon elágazódva a szürkeállomány ventromedialis területén a ventralis szarvig is eljutottak. Az axonok nagy részét a lateralis motoros oszlop területéig tudtuk követni, ahol szoros appozíciókat alakítottak ki a biocitinnel jelölt motoneuronok sejttestén (**24. A ábra**) és dendritjein (**24. B ábra**).

Nagy nagyítású fénymikroszkópos vizsgálatokkal 632, a gerincvelő különböző szegmentumaiban elhelyezkedő motoneuronon kerestük meg a szoros összefekvéseket a motoneuronok szómái, dendritjei és az anterográd módon jelölődött CIN-ok axon terminálisai között (**3. táblázat**). Alapos vizsgálattal 291 esetben találtunk fénymikroszkóposan azonosítható szoros appozíciót. Az egyes motoneuronok 1-3 kontaktust fogadtak, melyek negyedét a szómákon, háromnegyedét a dendriteken találtuk. A dendritikus appozíciók kizárólagosan a dendritek proximális részén helyezkedtek el. A CIN-ok és motoneuronok közötti szinaptikus kapcsolat meglétét igazolandó, elektronmikroszkópos vizsgálatokat is végeztünk, mellyel mind axoszomatikus (**24. C ábra**), mind axodendritikus kapcsolatra (**24. D ábra**) találtunk példákat.



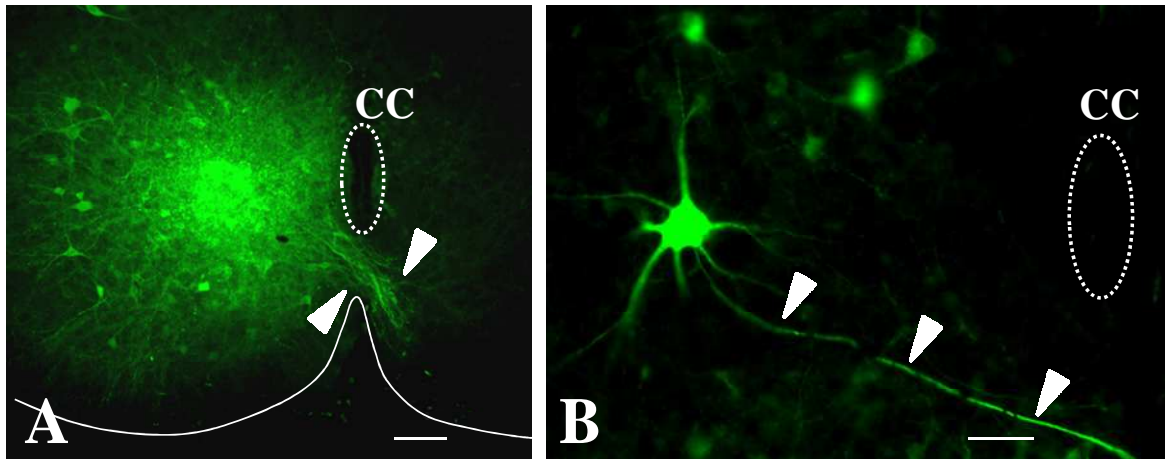
24. ábra: Commissuralis interneuronok (CIN) és motoneuronok kapcsolatai. Az **A** és **B**-jelű fénymikroszkópos felvételeken az anterográd módon jelölt commissuralis interneuronok axon terminálisainak egy motoneuron szómájával (**A**) és egy dendrittel (**B**) képzett szoros összefekvéseit láthatjuk (nyilak). A szinaptikus kapcsolat meglétét igazoló elektronmikroszkópos felvételek közül a **C**-jelű fotón egy jelölt CIN axon terminálisnak (**a**) egy motoneuron szómájával (**s**) kialakított szinaptikus kapcsolata látható (nyílhegyek). A **D**-jelű fotón a jelölt CIN terminális (**a1**) egy motoneuron dendrittel (**d**) alakít ki szinapszist (nyílhegyek). A fotón látható egy nem jelölt axon terminálisnak (**a2**) ugyanazon dendrittel kialakított aszimmetrikus szinaptikus kapcsolata is. Kalibrációs egyenesek: $10\ \mu\text{m}$ az **A** és **B**, és $0.5\ \mu\text{m}$ a **C** és **D** képeken.

3. táblázat: Commissuralis interneuronok (CIN) axon terminálisai és a motoneuronok (MN) közötti kapcsolatok.

Állatok	Vizsgált MN-ok száma	Kapcsolatokat fogadó MN-ok száma	Kapcsolatok száma a MN-okon	Kapcsolatok a sejttesten	Kapcsolatok a proximális dendriteken
BDA 2	130	55	75	20	55
BDA 4	173	78	98	22	52
BDA 6	98	58	79	18	61
BDA 7	120	50	69	21	48
BDA 11	111	50	71	9	62
Összesen	632	291	392	90	302

4. 2. 6. Commissuralis interneuronok neurotranszmitter tartalmának vizsgálata fluorescens jelölési technikával

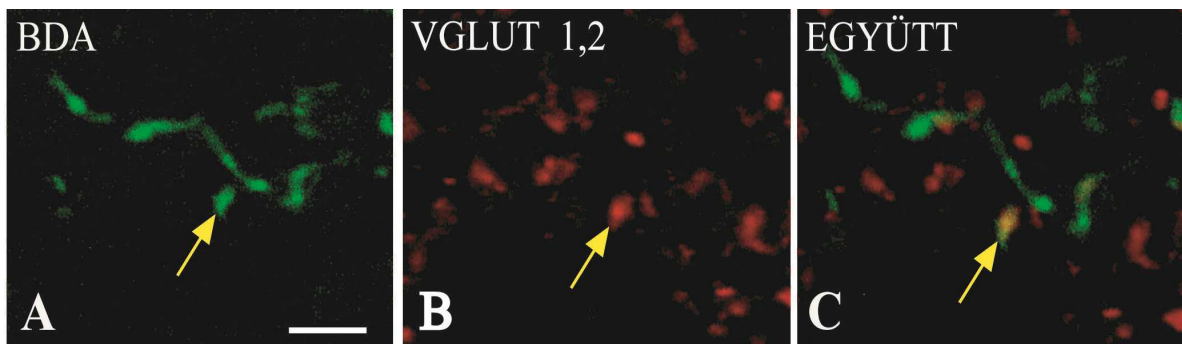
A commissuralis interneuronok axon terminálisainak jelölésére BDA-t injektáltunk a gerincvelői szürkeállomány ventromedialis részébe (25. A ábra).



25. ábra: Commissuralis interneuronok (CIN) fluorescens jelölése a gerincvelői szürkeállomány ventromedialis területébe való injektálással. A: Az injekciós hely fényképe, melyen jól látszanak a jelölt commissuralis interneuronok középvonalon áthaladó axonjai (nyilak). B: Egy jelölt commissuralis interneuron, a képen a nyílhegyek a sejt axonjára mutatnak. Kalibrációs egyenesek: 50 μm az A, 25 μm a B ábrán. cc: canalis centralis.

Az injekció oldalán elhelyezkedő iCIN-okból eredő axonköteg a középvonalat a ventralis commissurában keresztezve (**25. A ábra, nyílhegyek**) az ellenoldali szürkeállomány területén, a VII-es lamina és a lateralis motoros oszlop területén végződött gazdagon elágazódva. Vizsgálatainkban ezen CIN axon terminálisok neurotranszmitter tartalmát tanulmányoztuk. Az iCIN-ok többségének a szómája és dendritfájának nagy része is intenzív festődést mutatott (**25. B ábra**). Kísérleteinket 21, 5-8 napos patkányon végeztük. A nem megfelelő injekció, illetve elégtelen axon jelölődés következtében 15 állatot nem vettünk figyelembe az eredmények értékelésekor, így kvantitatív adataink 6 állatból származnak.

Többen kimutatták, hogy a vezikuláris glutamát transzporter fehérjék (VGLUT1,2) a glutamát szinaptikus vezikulákba történő szállítását végzik (Bai és mtsai, 2001; Varoqui és mtsai, 2002), és így az ellenük termeltetett antitestek a glutamáterg axon terminálisok speciális markereinek tekinthetők. Ezért a serkentő tulajdonságú CIN-ok kimutatására VGLUT1 és VGLUT2 antitesteket használtunk (**26. ábra**).



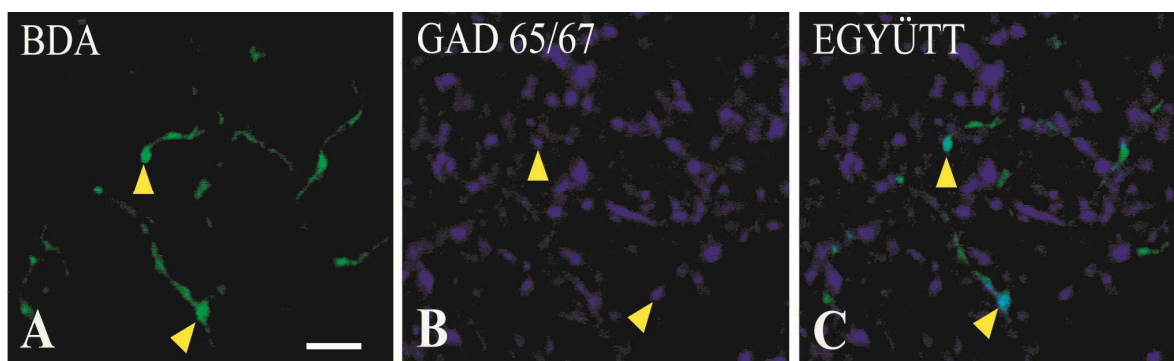
26. ábra: Glutamát neurotranszmittert tartalmazó commissuralis interneuron (CIN) axon terminális a gerincvelőben. A: BDA-val jelölt CIN axon terminálisok, B: VGLUT1,2 antitesttel jelölt axon terminálisok C: A nyíl egy VGLUT 1,2 antitesttel és BDA-val is jelölt CIN axon terminálisra mutat. Kalibrációs egyenes: 4 μ m.

A BDA és VGLUT1,2 immunoreaktivitás kolokalizációját négy gerincvelőben vizsgáltuk (**4. táblázat**). Az általunk vizsgált 590 BDA jelölt CIN axon terminálisból 158 esetben tudtunk kimutatni VGLUT1,2 immunopozitivitást (**26. C ábra**), azaz a CIN axon terminálisok közel negyede bizonyult serkentőnek.

4. táblázat: Vezikuláris glutamát transzportereket (VGLUT1,2) használó commissuralis interneuron axon terminálisok száma.

Állatok	BDA-jelölt axon terminálisok	VGLUT 1,2 immunoreaktivitást mutató axon terminálisok	
BDA 58	191	50	26%
BDA 62	172	50	29%
BDA 63	47	16	34%
BDA 74	180	42	23%
Összesen	590	158	27%

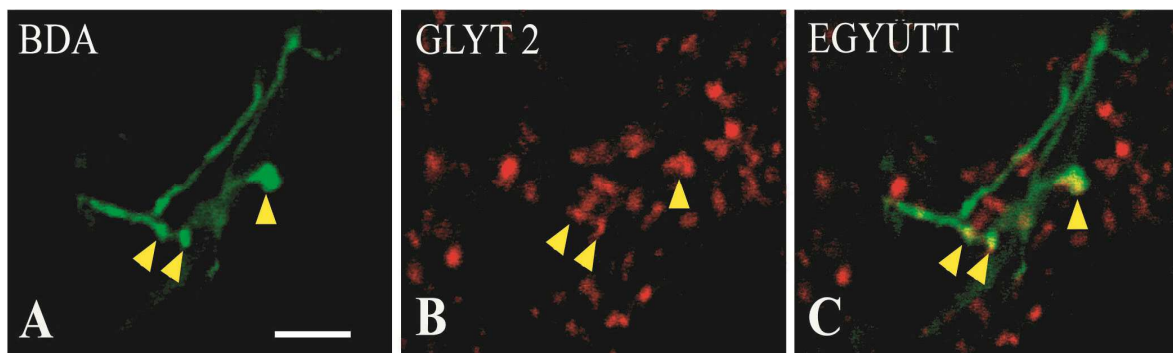
Általánosan elfogadott, hogy a gerincvelőben a GABA és a glicin a két fő gátló neurotranszmitter. A GABAerg gerincvelői interneuronokban a glutamát-dekarboxiláz enzim két formáját (GAD65 és GAD67) azonosították, amelyek a glutamát aminosav gamma-aminovajsavvá történő átalakítását katalizálják, ezért nagy koncentrációban vannak jelen a GABAerg terminálisokban (Mackie és mtsai, 2003, Tran és mtsai, 2003). Így azok a CIN-ok, amelyek GABA-t használnak ingerületátvivő anyagként, GAD65 és GAD67 enzimek ellen termeltetett antitestekkel jelölhetőek (27. ábra).



27. ábra: GABA neurotranszmittert tartalmazó commissuralis interneuron (CIN) axon terminálisok a gerincvelőben. A: BDA-val jelölt CIN axon terminálisok B: GAD 65/67 antitesttel jelölt axon terminálisok C: A nyílhegyek két GAD 65/67 antitesttel és BDA-val is jelölt CIN axon terminálisra mutatnak. Kalibrációs egyenes: 5 μ m.

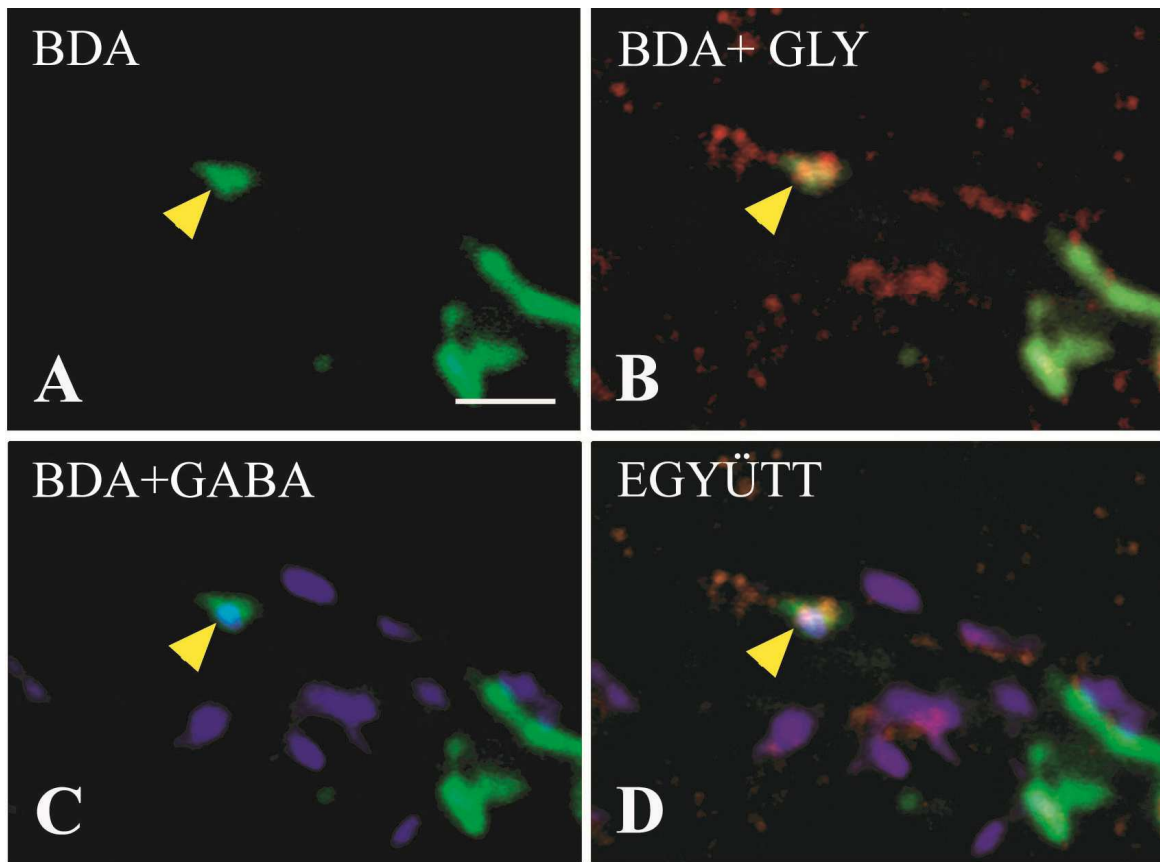
Öt állat ventralis szürkeállományában 1146 BDA-val jelölt CIN-t vizsgálva 350 reagált GAD65/67 antitesttel (**27. C ábra, 5. táblázat**). Adataink alapján a teljes gerincvelői CIN populáció 14%-a, míg a gátló CIN terminálisok egynegyede használ kizárólag GABA-t gátló neurotransmitterként.

A glicint mint neurotranszmittert használó axon terminálisok plazma membránja nagy affinitású transzport fehérjéket tartalmaz (GLYT1 és GLYT2), amelyek a glicin szinaptikus részből való eltávolításáért felelősek. Bizonyított, hogy a GLYT2 immunopozitív terminálisokban megtalálható a glicin (Spike és mtsai, 1997). Vizsgálatainkban 5 állatból származó 1146 BDA-val jelölt commissuralis axon terminálist vizsgáltunk, melyből 502, azaz az összes jelölt CIN terminális 44%-a volt GLYT2 immunopozitív (**28. ábra, 5. táblázat**).



28. ábra: Glicin neurotranszmittert tartalmazó commissuralis interneuron (CIN) axon terminálisok a gerincvelőben **A:** BDA-val jelölt CIN axon terminálisok, **B:** GLYT2 antitesttel jelölt axon terminálisok, **C:** A nyílhegyek GLYT2 antitesttel és BDA-val is jelölt CIN axon terminálisokra mutatnak. Kalibrációs egyenes: 4 μ m.

Számos morfológiai és fiziológiai vizsgálat bizonyítja, hogy a GABA és a glicin ugyanazon axon terminálisban is jelen lehetnek a gerincvelői szinapszisokban (Todd és Sullivan, 1990; Shupliakov és mtsai, 1993; Jonas és mtsai, 1998). Mindezek miatt e két neurotranszmitter kolokalizációját is tanulmányoztuk a gerincvelői CIN axon terminálisokban (**29. ábra**). A vizsgált 350 GAD tartalmú terminális közel fele csak GAD 65/67-et (161 terminális), míg valamivel több, mint a fele, a GAD 65/67 mellett GLYT2-öt is tartalmazott (189 terminális). Az 502 GLYT2-öt tartalmazó terminális közül 313 terminális mutatott kizárólag GLYT2 immunoreaktivitást. A vizsgált gátló CIN terminálisok 29%-a (189 terminális) bizonyult mindkét markerre, GAD65/67-re és GLYT2-re pozitívnak, ami az összes BDA-jelölt terminális 17%-a (**5. táblázat**).



29. ábra: GABA és glicin neurotranszmittert is tartalmazó commissuralis interneuron (CIN) axon terminális a gerincvelőben. **A:** BDA-val jelölt CIN axon terminálisok, **B:** A nyíl egy GLYT2 antitesttel és BDA-val egyaránt jelölt CIN terminálisra mutat, **C:** A nyíl egy GAD 65/67 antitesttel és BDA-val is jelölt CIN axon terminálisra mutat, **D:** A nyíl egy GABA-t és glicint egyaránt tartalmazó BDA-val jelölt CIN axon terminálisra mutat. Kalibrációs egyenes: 2 μ m.

Vizsgálataink alapján azt mondhatjuk, hogy az újszülött patkányok commissuralis interneuronjai neurotranszmittereiket tekintve heterogén populációt képviselnek (**5. táblázat**). A BDA-val jelölt CIN terminálisok neurotranszmitterekre specifikus fehérjékre adott immunoreaktivitása azt mutatta, hogy a CIN terminálisok egynegyede lehet glutamátot használó serkentő neuron, míg több mint felük (58%) gátlónak bizonyult. A gátló terminálisok közel felében (47%) kizárólag glicin található, egynegyedük (24%) csak GABA-t használ neurotranszmitterként, míg valamivel több, mint negyedükben (29%), mindkét gátló aminosav megjelenik.

5. táblázat: Gátló ingerületátvivő anyagot használó: glutaminsav-dekarboxiláz 65/67-et (GAD65/67) és/vagy glicin transporter 2-t (GLYT 2) tartalmazó biotinilált dextrán aminnal (BDA) jelölt commissuralis interneuron (CIN) axon terminálisok száma és aránya.

Állatok	BDA-jelölt axon terminálisok	Gátló axon terminálisok		Immunoreaktivitást mutató gátló terminálisok		
				GAD65/67	GLYT2	GLYT2 és GAD65/67
BDA 58	140	63	45%	19	32	12
BDA 60	301	155	51%	36	84	35
BDA 62	155	104	67%	45	39	20
BDA 63	328	189	58%	30	101	58
BDA 64	222	152	68%	31	57	64
Összesen	1146	663	58%	161	313	189
A BDA-jelölt axon terminálisok arányában				14%	27%	17%
A gátló axon terminálisok arányában				24%	47%	29%

5. MEGBESZÉLÉS

5. 1. Utolsó rendű premotor interneuronok primer afferensekkel létesített kapcsolatai

5. 1. 1. Utolsó rendű premotor interneuronok és primer afferensek jelölése

Az utolsó rendű premotor interneuronok jelölésére felnőtt patkányban BDA-t vagy Neurobiotint injektáltunk iontoforetikusan a lateralis motoros oszlop területére. A BDA-t axon terminálisok, dendritok és sejttestek egyaránt képesek felvenni, a jelölőanyag pedig mind anterográd, mind retrográd irányban kiválóan transzportálódik (Veenman és mtsai, 1992; Rajakumar és mtsai, 1993). A lateralis motoros oszlop területén a motoneuronokon kívül interneuronok sejttestei is felvehették a jelölőanyagot. Csirke gerincvelőben azonban kimutatták, hogy a motoneuronok között csak elhanyagolható számban találhatunk interneuronokat (Antal és Polgár, 1993; Antal és mtsai, 1994; Berki és mtsai, 1995), másrészt a ventralis szürkeállományban található interneuronok dendritjei csak ritkán lépnek be a motoros oszlop területére (Antal és Polgár, 1993). Az injekciós területen a motoneuronokon és az általunk jelölni kívánt LOPI-ok axonjain kívül a jelölőanyagot olyan, propriospinalis és supraspinalis neuronok is felvehették, amelyek axonjai a lateralis motoros oszlophoz küldenek kollaterális ágakat. Az ily módon jelölődött sejtek száma azonban elhanyagolható lehet, mivel a BDA-t és a Neurobiotint csak az injekció területén áthaladó sérült rostok veszik fel, intakt axonok nem (Veenman és mtsai, 1992; Rajakumar és mtsai, 1993; Sidibé és Smith, 1996). Több kísérletes megfigyelés is azt mutatta, hogy az általunk is használt iontoforetikus injektálás csak minimális szöveti roncsolódást okoz, így a jelölőanyag áthaladó rostok általi felvétele elhanyagolható (Sidibé és Smith, 1996; Puskár és Antal 1997).

Úgy gondoljuk, hogy a BDA-val és Neurobiotinnal jelölt LOPI-ok eloszlásában megfigyelhető különbséget nem a jelölőanyagok eltérő volta, hanem az injekciók különböző mérete és/vagy a lateralis motoros oszlopon belüli eltérő lokalizációja magyarázza.

A hátsó gyökéren alkalmazott HRP és a nervus ischiadicusba adott CTb injekció nagyszámú vastag mielinizált primer afferens rost jelölődését eredményezte, melyek az V-VII-es laminák területén végződtek. A jelölődött primer afferensek és LOPI-ok közti

kapcsolatok elemzésénél figyelembe kell venni azt, hogy a BDA és a Neurobiotin nem minden esetben tüntette fel premotor interneuronok teljes dendritarborizációját. Mivel azonban a lateralis motoros oszlopba adott injekció a LOPI-ok dendritfáinak igen intenzív festődését eredményezte, valószínűsíthető, hogy az esetek nagy részében a jelölőanyag csupán a legdistalisabb dendriteket nem festette meg.

Mind a retrográd módon jelölt LOPI-ok mind az anterográd módon jelölt PA rostok rendkívül intenzív jelölődése olyan nagyszámú sejtet és rostot tartalmazó mintát szolgáltatott számunkra, amiről úgy gondoljuk, hogy elégségesen nagy volt ahhoz, hogy eredményeink a teljes LOPI populációra vonatkoztatva reprezentatívak legyenek. A jelölési módszerek bizonyos korlátait figyelembe véve, és a kapott számszerű adatokat megfelelő elővigyázatossággal kezelve jelen munka a LOPI-ok és a primer afferensek közti szoros appozíciók első kvantitatív morfológiai leírása.

5. 1. 2. Primer afferensektől monoszinaptikus bemenetet fogadó LOPI-ok

Munkánkban morfológiai módszerekkel kimutattuk, hogy a PA terminálisok közvetlen kapcsolatokat létesítenek LOPI-okkal, ugyanakkor eredményeink azt mutatják, hogy a LOPI-oknak csak kevesebb, mint 10% -a fogad néhány monoszinaptikus bemenetet primer afferensektől. Ez a relatíve kisszámú input azonban mégis effektíven befolyásolhatja a LOPI-ok működését.

Interneuronokból és az általuk innervált motoneuronokból történő szimultán extra- és intracellulláris elvezetéseket alkalmazva számos laboratóriumban vizsgálták a primer afferensek ingerlésének hatására az utolsó rendű premotor interneuronokon kiváltott válaszokat. Kimutatták, hogy I-es és II-es típusú izom afferensek (Cavallari és mtsai, 1987; Edgley és Jankowska, 1987; Shefchyk és mtsai, 1990) és alacsony ingerküszöbű bőr afferensek (Fleshman és mtsai, 1984, 1988; Schmidt és mtsai, 1989; Moschovakis és mtsai, 1992) egyaránt monoszinaptikus bemenetet szolgáltatnak az LOPI-ok számára. Fiziológiai kísérletek alapján azt is tudjuk, hogy bizonyos körülmények között az izom és bőr afferensek stimulációja diszinaptikus EPSP-t és IPSP-t tud kiváltani gerincvelői motoneuronokon. Mindez arra utal, hogy az általunk azonosított néhány kontaktus is képes lehet a LOPI-ok tüzelését kiváltani és ennek révén a szenzoros impulzusokat közvetlenül a motoneuronok felé továbbítani. (McCrea és mtsai, 1995; Angel és mtsai, 1996; Quevedo és mtsai, 2000; Jankowska, 2001).

Jelen munka elsőként mutatja be a primer afferensektől monoszínaptikus bemenetet fogadó LOPI-ok lamináris és szegmentális eloszlását patkány lumbalis gerincvelőjében. Kísérleteink alapján a PA-ekkel szoros appozíciót létesítő LOPI-ok a lumbalis gerincvelő V-VII-es lamináiban az injekcióval ipsilateralisan, attól legfeljebb 2-3 szegmentumnyi távolságban helyezkedtek el. Ezen a gerincvelői területen korábban Jankowska (1992) motoneuronokkal monoszínaptikus kapcsolatban lévő, Ia és Ib bőr és ízületi afferensek által serkentett neuronokat talált.

5. 1. 3. Szenzoros információk hatása a LOPI-ok működésére

A primer afferensek által közvetített idegi impulzusok a gerincvelői motoros apparátus különböző szintjein hathatnak. Ha a primer afferensek a ritmusgenerátor szinten hatnak, akkor maga a ritmus szenvedhet zavart a ciklus eltolódása, vagy fáziskiesés következhet be. Ha a hatás a mintázatgenerátor szinten nyilvánul meg a motoneuronok aktivitási szintje (izomerő) változhat, illetve adott cikluson belül fáziseltolódás következhet be. A mintázatgenerátor szinten történő „zavaró” hatás eredményeként akár bizonyos motoneuron csoportok működése szünetelhet, majd fáziseltolódás nélkül térhetnek vissza az eredeti ciklusba (Rybak és mtsai, 2006).

A primer afferensek ingerlése választ válthat ki a premotor interneuronok illetve a motoneuronok szintjén is. Kimutatták, hogy I-es és II-es típusú izom és bőr afferensek monoszínaptikus kapcsolatot alakítanak ki gerincvelői motoneuronokkal (Brown és Fyffe, 1981; Edgley, 2001; Quevedo és mtsai, 2000) és premotor interneuronokkal (Angel és mtsai, 1996; Cavallary és mtsai, 1987; Czarkowska és mtsai, 1981; Degtyarenko és mtsai, 1996, 1998; Edgley és Jankowska, 1987; Fleshman és mtsai, 1984; Harrison és mtsai, 1986; McCrea és mtsai, 1995; Moschovakis és mtsai, 1992; Quevedo és mtsai, 2000; Shefchyk és mtsai, 1990). Ugyanakkor fiziológiai kísérletek alapján a motoneuronokhoz és premotor interneuronokhoz menő szenzoros bemenet többnyire nem elég erős ahhoz, hogy a gerincvelői motoneuronok tüzelését kiváltsa, mivel a perifériás idegek elektromos stimulációja csak kis amplitúdójú mono-és diszínaptikus potenciált váltott ki gerincvelői motoneuronokon (Burke, 1991). Mások eredményei viszont azt mutatják, hogy az általunk azonosított kevés számú primer afferens-LOPI kontaktus is képes lehet a szenzoros impulzusokat közvetlenül a motoneuronok felé továbbítani. McCrea és mtsai (1995) arra a következtetésre jutottak, hogy az extensor motoneuronok primer afferensek általi diszínaptikus serkentése, mint feedback mechanizmus, a lépésciklus extensor fázisának

megerősítésében játszik szerepet. Quevedo és mtsai (2000) kísérleteikben szintén arra a következtetésre jutottak, hogy az I-es típusú afferenseknek az extensor és flexor motoneuronok diszinaptikus serkentésével az éppen végbemenő motoros aktivitás stabilizálásában van fontos szerepük.

Vizsgálataink alapján a LOPI-oknak csak kis százaléka fogad közvetlen bemenetet primer afferensektől, így az általunk az V-VII-es laminákban talált nagyszámú PA terminális által közvetített szenzoros hatás a gerincvelői mozgató rendszer más neuronjaihoz juthat el. E sejtek egy része a gerincvelői ritmusgeneráló hálózat eleme lehet, amely a szenzoros információkat a LOPI-ok felé továbbítja. A LOPI-ok ezután integrálják a különböző interneuronok által feldolgozott szenzoros információkat a primer afferensektől érkező közvetlen szenzoros inputokkal és küszöb feletti ingerlés esetén tovább adják ezen impulzusokat a motoneuronoknak glutamát, glicin vagy GABA neurotranszmitterek közvetítésével. Végül a motoneuronok integrálják a sejttestükön és dendritjeiken fogadott posztzinaptikus potenciálokat a primer afferensektől közvetlenül fogadott bemenetekkel (Barry és 'O Donovan, 1987; Burke, 2001 és mtsai; Ho és 'O Donovan, 1993). Ezen integratív folyamat eredménye a motoneuronok térben és időben koordinált tüzelési mintázata, amely alapvető a motoros működések megfelelő kivitelezéséhez.

5. 2. Commissuralis interneuronok

5. 2. 1. Commissuralis interneuronok jelölése

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a gerincvelő két oldalán található flexor és extensor motoneuron csoportok közti alternáció létrehozásáért felelős neuronok újszülött patkány lumbalis gerincvelőjének ventromedialis területén találhatóak (Kjaerulff és Kiehn, 1996). Szintén megállapították, hogy az itt található neuronok többségének axonja a ventralis commissurában kereszteződve a contralateralis szürkeállomány területén végződik (Puskár és Antal, 1997; Eide és mtsai, 1999; Stokke és mtsai, 2002), azaz commissuralis interneuron. A CIN-ok a neuronális jeleket a gerincvelő két oldala között közvetítve a bal-jobb oldali alternáció létrehozásának esszenciális elemei.

A commissuralis interneuronok vizsgálatára két okból is fiatal (5-8 napos) patkányokat választottunk: egyrészt az ilyen típusú sejtekről szerzett információink döntő

többsége újszülött patkányok fiziológiai és farmakológiai vizsgálataiból származik, így morfológiai eredményeink a hasonló életkorú állatokéval jobban összevethetőek. Másrészt, az általunk is használt *in vitro* jelölési technika esetében a gerincvelők oxigenizált mesterséges agy-gerincvelői folyadékban tartása fiatal (<14. postnatalis nap), még fejletlen mielinhüvellyel rendelkező gerincvelők esetében biztosítja igazán a szerkezet megtartottságát, és így a kísérletek kivitelezhetőségét. Ennek az Otsuka és Konishi (1974) által kialakított *in vitro* technikának a módosított változatát Kudo és Yamada (1987), valamint Smith és Feldman (1987) használta először a gerincvelői ritmusgenerátor tanulmányozására. E technikának sok előnye van a korábban elterjedt macska *in vivo* preparátummal szemben. Az újszülött rágcsáló gerincvelőt könnyű izolálni, és megfelelő fiziológiai környezetben (ACSF, oxigenizálás, szobahő) több órán át túlélhető. A gerincvelőt körülvevő médium kémiai paraméterei jól kontrollálhatóak, és szükség esetén módosíthatóak.

A CIN-ok jelölésére BDA-t injektáltunk iontoforetikusan újszülött 5-8 napos patkányok lumbalis gerincvelőinek ventromedialis területébe. Az injekcióval azonos oldalon a CIN-ok (iCIN) sejtestükön és dendritjeiken keresztül felvették a jelölőanyagot, majd az axonjukba transzportálták azt. A jelölődött axonok a ventralis commissurában az ellenoldalra kereszteződtek, ahol gazdagon elágazódtak a szürkeállomány területén. Emellett, jelölődtek olyan CIN-ok is (cCIN), amelyeknek az injekció területén végződő axonja vette fel a BDA-t, majd a sejtest és a dendritek irányába transzportálta azt. Ezeket a retrográd módon jelölődött sejtesteket az injekcióval ellentétes oldalon találtuk.

Természetesen nem állíthatjuk azt, hogy a jelölt axon terminálisok kizárólagosan CIN-októl származnak. A jelölőanyagot ugyanis, az injekció helyén áthaladó projekciós neuronok is felvehették. Bár ezt a lehetőséget nem zárhatjuk ki, mégis úgy gondoljuk, hogy az ily módon jelölődött terminálisok száma elhanyagolható. Ennek magyarázata az, amit az utolsó rendű premotor interneuronok jelölésével kapcsolatban már említettünk: a BDA-t csak sérült rostok veszik fel, s az iontoforetikus injektálás csak minimális szöveti roncsolódást okoz (Rajakumar és mtsai, 1993; Sidibe és Smith, 1996; Puskár és Antal, 1997). Jól ismert tény, hogy a gerincvelő különböző lamináiból (elsősorban az I-II-es laminából) származó és az anterolaterális fasciculusban felszálló rostok áthaladhatnak az injekciós hely területén. A BDA injekciót követően azonban nem találtunk jelölt sejteket az I-II-es laminák területén. Ezek alapján úgy gondoljuk, hogy ha jelölődtek is áthaladó rostok, azok száma elhanyagolható, így az esetleges minimális nem specifikus festődés vizsgálataink fontosabb kvantitatív eredményeit nem befolyásolja.

5. 2. 2. Utolsó rendű commissuralis interneuronok megoszlása és morfológiája

Régóta ismert, hogy a gerincvelői szürkeállomány ventromedialis területén olyan neuronok találhatóak, melyek axonja a sejttesttel ellenkező oldalra kereszteződik (Ramon y Cajal, 1909, Scheibel és Scheibel, 1969; Matsushita, 1970). Ezek közül a sejtek közül néhány supraspinalis rostokat ad, de többségük az ellenoldali szürkeállomány területén végződik (Szentágothai, 1951; Willis és Willis, 1966; Grillner és Hongo, 1972; Yoshida és mtsai, 1998; Eide és mtsai, 1999; Stokke és mtsai, 2002). Macska hátsó végtagi izmokba adott transzneurális WGA (wheat germ agglutinin) (Harrison és mtsai, 1986; Jankowska és Skoog, 1986), valamint patkány gerincvelő lateralis motoros oszlopába adott BDA injekció (Puskár és Antal, 1997) commissuralis interneuronokat is feltüntetett, ami azt jelzi, hogy a ventromedialis szürkeállományban található CIN-ok egy része motoneuronokon végződik, azaz utolsó rendű commissuralis interneuronként (LOPCIN) definiálható. Macskában a m. semitendinosust és a medialis gastrocnemiust innerváló idegbe adott WGA-HRP injekció után jelölt sejteket contralateralisan a VIII-as laminában a L4-S1-es szegmentumok között találtak (Harrison és mtsai, 1986).

Kísérleteinkben a korábbi megfigyelésekkel összhangban a lumbalis 2-es és 4-es szegmentumok magasságában a lateralis motoros oszlopba adott injekció után retrográdan jelölt sejteket elsősorban az ellenoldali szürkeállomány ventromedialis területén (főként a VIII-as laminában, kisebb részben a X-es laminában, valamint a VII-es lamina ventromedialis részén) találtunk. Bebizonyítottuk, hogy a ventromedialis szürkeállományban található CIN-ok axon terminálisai szoros appozíciókat alakítottak ki a motoneuronok szómáival és proximális dendritjeivel, azaz LOPCIN-oknak bizonyultak. Ezen szinaptikus kapcsolatok meglétét elektronmikroszkópos szinten is igazoltuk.

Felnőtt patkány L1-L2-es, valamint L3-4-es szegmentumai magasságában a lateralis motoros oszlopba adott BDA injekció után a jelölt LOPCIN-ok a gerincvelő 3-4 szegmentum hosszúságú szakaszán, azaz a kapcsolódó motoneuronoktól maximum 2 szegmentum távolságban voltak megtalálhatóak (Puskár és Antal, 1997). Vizsgálataink alapján azonban úgy tűnik a LOPCIN-ok újszülött patkányban a motoneuronoktól jóval nagyobb rostrocaudalis távolságban is elhelyezkedhetnek, mint a felnőtt állatban, mivel a L2-es vagy a L4-es gerincvelői szegmentumok magasságában a lateralis motoros oszlopba adott injekció után a teljes lumbalis gerincvelő területén találtunk jelölt LOPCIN-okat. Ezen LOPCIN-ok többsége a jelölt motoneuronokkal azonos szegmentumban volt megtalálható, de néhány közülük a motoneuronoktól 3-4 szegmentumnyi távolságban

helyezkedett el. Az ilyen távolságban jelölődött LOPCIN-ok hosszú felszálló és/vagy leszálló axonokon keresztül kapcsolódhatnak a contralateralis motoneuronokkal. 4-5 szegmentum távolságba projiciáló fel- és leszálló axonnal rendelkező CIN-okat korábbi kísérletekben is leírtak (Eide és mtsai, 1999; Stokke és mtsai, 2002).

Másik megfigyelésünk az volt, hogy habár a LOPCIN-ok a teljes lumbalis gerincvelő területén megtalálhatóak, eloszlásuk a gerincvelő rostrocaudalis tengelye mentén egyenetlen. A L2-es és L4-es szegmentumok magasságában a motoros oszlopba adott BDA injekció után nagyszámú jelölt LOPCIN-t találtunk a L1-L4-es szegmentumok területén, míg a L5-6-os szegmentumokban csak kevés sejt jelölődött. Mindez azon megfigyeléseket erősíti, melyek szerint a lumbalis 1-4-es szegmentumokban tekintélyes mennyiségű fel és/vagy leszálló axonnal rendelkező LOPCIN található (Eide és mtsai, 1999; Stokke és mtsai, 2002), míg a L5-6-os szintjén csak kevés felszálló axonnal rendelkező LOPCIN van. Mindamellet, a L4-es szinten a ventromedialis szürkeállományba adott BDA injekció után nem csak a L1-L4-es, hanem caudalisan a L5-L6-os szegmentumok ventromedialis szürkeállományában is jelentős mennyiségű jelölt CIN-t találtunk. Ebből arra következtethetünk, hogy a L5-6-os szegmentumok is nagy számban tartalmazhatnak aCIN-okat, ezek axonjai azonban többnyire a contralateralis ventromedialis szürkeállomány területén végződnek, s csak kevés létesít monoszinaptikus kapcsolatot az ellenoldali motoneuronokkal.

Felnőtt patkányban a medialis motoros oszlopba adott injekció után jelentős számú LOPCIN jelölődött, a lateralis motoros oszlopbeli injekció után azonban az összes retrográdan jelölt LOPI-nak csak 2-6%-a bizonyult LOPCIN-nak, azaz helyezkedett el az injekcióval contralateralisan (Puskár és Antal, 1997). Ugyanakkor újszülött patkányokban a lateralis motoros oszlopba adott injekciót követően a jelölt premotor interneuronok 18%-a bizonyult LOPCIN-nak. Ez a LOPCIN-ok számában megfigyelhető lényeges eltérés arra utalhat, hogy a motoneuronokkal monoszinaptikusan kapcsolódó CIN-ok szerveződésében jelentős posztnatális átszerveződés következik be. Ez történhet úgy, hogy a meglévő LOPCIN-ok közül sejtek halnak el programozott apoptózis során. Másik lehetőségként egyes LOPCIN-ok axon arborizációja posztnatálisan átszerveződhet olyan módon, hogy a motoneuronokkal meglévő monoszinaptikus kapcsolataikat elveszítik miközben a LOPCIN-ok felől a motoneuronokhoz történő diszinaptikus és poliszinaptikus útvonalak érintetlenek maradnak (Jankowska és Noga, 1990). Újszülött patkányban fiziológiai kísérletekben di- és poliszinaptikus kapcsolatok meglétét korábban igazolták (Kjaerulff és Kiehn, 1997).

Járás során a végtag szinergista izmainak (pl. bal csípő flexorok) kontrakciójával egy időben az ellenkező oldalon az antagonista izmok (pl. a jobb csípő extensorok) is összehúzódnak. A végtagok izmainak ezen koordinációja szegmentálisan, valamint interszegmentálisan projíciáló LOPCIN-ok által irányított. A szegmentális LOPCIN-motoneuron kapcsolatok a két oldal közti szoros alternáció létrehozásában meghatározóak, míg a hosszú fel- és/vagy leszálló axonnal rendelkező interszegmentális LOPCIN-ok adott végtag különböző ízületeinek működését koordinálhatják (Kiehn és mtsai, 2010).

5. 2. 3. Kétoldali commissuralis interneuronok közti reciprok kapcsolatok

Orsóhalon és *Xenopus* embrión végzett számos fiziológiai kísérlet során kimutatták, hogy a kétoldali CIN-ok között reciprok gátló kapcsolat van, mely a kétoldali törzsizmok alternált kontrakciójának irányításával, az úszómozgás létrehozásának egyik kulcsfontosságú eleme (Buchanan, 1982.; Dale 1985; Roberts, 1990, Arshawsky és mtsai, 1993; Grillner és mtsai, 1995).

Kísérleteinkben azt találtuk, hogy a szürkeállomány ventromedialis területébe adott BDA injekció után a contralateralis oldalon jelölt CIN-ok szoros appozíciókat alakítottak ki az injekcióval azonos oldalon jelölődött iCIN-okkal így először sikerült kimutatnunk CIN-CIN közti reciprok kapcsolat meglétét emlős gerincvelőben. Emellett azonban nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét sem, hogy az általunk azonosított kapcsolatok egy része ipsilateralis helyzetű CIN-ok axon kollaterálisaitól származik. Ugyanakkor, korábbi vizsgálatokban patkányok lumbalis gerincvelőjének ventralis szürkeállományába adott fluorescens festékek alkalmazása után csak nagyon kis számban találtak a sejttel azonos oldalon elágazódó CIN axon kollaterálisokat (Eide és mtsai, 1999), valamint újszülött egér commissuralis interneuronjait tanulmányozva szinte kizárólagosan csak a sejttel ellenoldalra haladó axon kollaterálisokat írtak le (Quinlan és Kiehn, 2007). Így nagyon valószínű, hogy a ventromedialis BDA injekció után a contralateralisan jelölődött CIN-ok és ipsilateralisan jelölt axonok terminálisai közti kontaktusok valóban CIN-CIN kapcsolatot jelentenek. Azon megfigyelésünk pedig, hogy commissuralis terminálisoktól kontaktust fogadó CIN-okat nem csak a tracer alkalmazásának szintjén, hanem az injekciótól rostralisan és caudalisan is találtunk, arra utal, hogy nem csak intra-, hanem interszegmentális CIN-CIN kapcsolatok is jelen vannak. Eredményeink azt sugallják, hogy a commissuralis interneuronok közti reciprok interakciók igen erősek lehetnek, mivel a

vizsgált CIN-ok csaknem fele (49%) szoros appozíciót alakított ki az ellenoldali CIN-ok axon terminálisaiival.

5. 2. 4. A commissuralis interneuronok neurotranszmitterei

5. 2. 4. 1. Serkentő commissuralis interneuronok

A vezikuláris glutamát transzportereket a glutamátot neurotranszmitterként használó serkentő tulajdonságú axonok specifikus markereként tekintik, mivel mind az agyban, mind a gerincvelőben megtalálták őket a korábban glutamátergként azonosított neuronokban (Fremeau és mtsai, 2001; Varoqui és mtsai, 2002; Todd és mtsai, 2003). A glutamát transzporterek a szinapszisokban található transzmitterek szinaptikus vezikulákba való juttatásában működnek közre. Az agykéregben, a kisagyban és a hippocampusban VGLUT1-t és VGLUT2-t expresszáló különböző fiziológiai tulajdonságú axon terminálisokat írtak le (Fremeau és mtsai, 2004).

A *Xenopus* ebihal és az orsóhal esetében a glicinerg CIN-ok mellett glutamáterg CIN-okat is leírtak. *Xenopus*ban a contralateralis myotomalis izomzat kontrakcióját elindító dorsolateralis CIN-ok (Sillar és Roberts, 1988) és a struggling (Speciális mozgásforma, hátrafele úszva menekülés, amelyet akkor produkál az állat, ha megfogják, megragadják.) során meghatározó eCIN-ok (Li és mtsai, 2007), míg orsóhalban a contralateralis uszonyt mozgató CC3 sejtek (Mentel és mtsai, 2008) tartoznak ebbe a csoportba.

Kísérleteink során kimutattuk, hogy újszülött patkányokban a CIN axon terminálisok mintegy negyede (27%) VGLUT1 és/vagy VGLUT2 immunoreaktív, azaz újszülött patkányban a ventromedialis szürkeállomány CIN-jai glutamát neurotranszmittert is használnak. Hasonló eredményre jutottak újszülött egereken végzett morfológiai vizsgálatokban is, ahol a jelölt CIN populáció 26%-a volt glutamáterg (Restrepo és mtsai, 2009). Felnőtt patkány leszálló axonnal rendelkező interszegmentális CIN-jainak 75%-a viszont glutamátergnek bizonyult (Liu és mtsai, 2010). A szerzők szerint e jelentős különbség oka az, hogy ők csak a lateralis motoros oszlop területén található interszegmentálisan projíciáló CIN-okat vizsgálták, ráadásul felnőtt állatban. Elektrofiziológiai vizsgálatokban viszont mind az intraszegmentális (70%, Quinlan és Kiehn, 2007), mind az interszegmentális (77%, Butt és Kiehn, 2003) glutamáterg CIN-ok aránya jóval nagyobbak bizonyult, mint morfológiai vizsgálatokban. Ezen ellentmondás a

fiziológiai mintavétel részleges limitáltságából is adódhat, hiszen az csak a motoneuronokkal mono- vagy diszinaptikus kapcsolatban lévő CIN-okat vizsgálta, míg a morfológiai jelöléses vizsgálatok jóval szélesebb CIN populációról adnak képet (Restrepo és mtsai, 2009).

Korábbi fiziológiai vizsgálatokban kereszteződő glutamáterg CIN axonokat azonosítottak újszülött patkány gerincvelőben, amelyek contralateralis gátló premotor interneuronokon keresztül gátolták az ellenoldali motoneuronokat (Kjaerulff és Kiehn, 1997; Kremer és Lev-Tov, 1997). Patkányban (Butt és Kiehn, 2003) és macskában (Bannatyne és mtsai, 2003) az ellenoldali motoneuronokkal monoszínaptikusan kapcsolódó serkentő CIN-okat találtak. Úgy gondolják, hogy azok a glutamáterg CIN-ok, amelyek közvetlenül a motoneuronokkal kapcsolódnak a két hátsó végtag szinkron mozgásának (ugrás) létrehozásában alapvetőek, míg más glutamáterg CIN-ok Renshaw sejteken és Ia interneuronokon keresztül biztosítják a motoneuronok indirekt gátlását, mely a kétoldali alternáció létrehozásához járul hozzá (Kiehn, 2011).

Úgy tűnik, hogy az emlős gerincvelő két oldala közötti koordináció a keresztezett kapcsolatok serkentő és gátló komponenseinek egyensúlyától függ. EphrinB3 és ephrinA4 knockout egerekben olyan ipsilateralis serkentő CPG neuronokat írtak le, amelyek axonja mutáns egerekben keresztezi a középvonalat, így növelve a contralateralis oldal serkentő bemeneteinek arányát. A serkentés és gátlás közti egyensúly felborulása a motoneuronok együttes aktivációját váltja ki gerincvelő két oldalán, ami a végtagok szinkron mozgását eredményezi (Kullander és mtsai, 2003).

5. 2. 4. 2. Gátló commissuralis interneuronok

A GABA-t a glutamát-dekarboxiláz enzim szintetizálja, amelynek két izoformája (GAD65 és GAD67) igen magas koncentrációban található meg a GABA-t neurotranszmitterként használó preszinaptikus terminálisokban (Kaufman és mtsai, 1991; Reetz és mtsai, 1991). Úgy találták, hogy a GABAerg gerincvelői neuronok mindkét GAD isoformát tartalmazzák, bár eloszlásuk a neuronokban eltérő. A GAD67 elsősorban a sejtestben, míg a GAD65 az axon terminálisokban található meg (Soghomonian és Martin, 1998; Mackie és mtsai, 2003).

A gátló posztszinaptikus potenciált kiváltó glicint felszabadító axon terminálisok olyan nagy affinitású glicin transzportereket expresszálnak GLYT1, GLYT2, amelyek a glicint távolítják el a szinaptikus részből. Gerincvelőben, agytörzsben és a kisagyban a

GLYT2 megfigyelt eloszlása azt sugallja, hogy ez a fehérje kolokalizál a glicinnel és megtalálható a bizonyítottan glicinerg axon terminálisok preszinaptikus membránjában (Zafra és mtsai, 1995; Spike és mtsai, 1997; Geiman és mtsai, 2002).

A gerincesek motoros aktivitását a gerincvelő két oldalán található neuronális hálózatok hozzák létre. Alacsonyabbrendű gerincesekben, orsóhalban és *Xenopus* embrióban a középvonalat keresztező CIN-ok döntő többsége gátolja a contralateralis CPG tagjainak működését (Grillner és mtsai, 1995; Roberts és mtsai, 1998, Mahmood és mtsai 2009), ezáltal meghatározó szerepet játszik az úszómozgás során megfigyelt alternáló motoros mintázat létrehozásában. Farmakológiai és immunhisztokémiai vizsgálatokkal kimutatták, hogy a CIN-ok gátló hatásáért mindkét fajban glicinerg neurotranszmisszió felelős (Buchanan, 1982; Dale, 1985).

Újszülött patkány gerincvelőn végzett fiziológiai vizsgálatok azt mutatták, hogy a motoneuronokon megfigyelt ritmikus aktivitást létrehozó hálózatot főként ipsilateralis glutamaterg serkentő neuronok alkotják (Casalets és mtsai, 1996; Butt és Kiehn, 2003; Clarac és mtsai, 2004; Kiehn, 2006), a gerincvelő két oldala közti aktivitás koordinálásáért pedig gátló CIN-ok a felelősek. Kísérleteinkben a vizsgált CIN terminálisok 58%-a bizonyult gátlónak, amelyeknek mintegy háromnegyede (663-ból 502, 76%) volt glicinerg. Glicinerg CIN-okat mások is azonosítottak patkány gerincvelőben (Butt és Kiehn, 2003; Liu és mtsai, 2010), egérben (Lanuza és mtsai, 2004; Restrepo és mtsai, 2009) és macskában (Bannatyne, 2003). Mindez arra utal, hogy a keresztezett glicinerg transzmisszió meghatározó szereppel bír emlős gerincvelőben is. Fiziológiai kísérletekből tudjuk, hogy újszülött patkány gerincvelő L2-es szegmentumának glicinerg interszegmentális CIN-jai monoszínaptikusan gátolják a gerincvelő L4-es szegmentumában contralateralisan elhelyezkedő motoneuronokat (Butt és Kiehn, 2003). Hasonló neuronokat azonosítottak macskában is, ahol a L3-5-ös szegmentumok glicinerg CIN-jai gátolták a L7-es szegmentum contralateralis interneuronjait és motoneuronjait (Bannatyne és mtsai, 2003). Genetikai és fiziológiai vizsgálatok alapján egérben olyan felszálló axonnal rendelkező CIN-okat írtak le, amelyek a contralateralis motoneuronok működését glicinerg úton gátolhatják (Lanuza és mtsai, 2004).

Eredményeink alapján a gátló tulajdonságú CIN-ok valamivel több, mint fele (663-ból 350) mutatott GAD 65/67 immunreaktivitást, ami a teljes CIN populáció 31%-át jelenti. Hasonló eredményre jutottak újszülött egereken végzett vizsgálatokban is, ahol a vizsgált CIN-ok 20%-a volt GABA-erg (Restrepo és mtsai, 2009). Mindez arra utal, hogy

rágcsálókban a glicin mellett a GABA is szerepet játszhat a bal-jobb oldali koordináció kialakításában.

Fiziológiai vizsgálatok alapján tudjuk, hogy a GABA az intrauterin fejlődés korai szakaszában (18 napnál fiatalabb patkány embrióban) serkentő hatású és szinkronizált ritmikus aktivitást hoz létre GABA_A receptoron keresztül (Nishimaru és Kudo, 2000; Nakayama és mtsai, 2002). Az embrionális fejlődés során ez a serkentő transzmisszió gátlóvá alakul, ami a gerincvelő két oldalának alternáló ritmikus aktivitásával jár együtt. A GABAerg neurotranszmisszióban bekövetkező változás a GABA_A receptor által szabályozott ionáram polaritásának változásával magyarázható (Wu és mtsai, 1992). A fejlődés későbbi szakaszában a GABA szintje jelentősen csökken, és a glicin válik a gerincvelő két oldala közti működést szabályozó domináns gátló transzmitterré (Tran és mtsai, 2003; Allain és mtsai, 2004, 2006).

A GABA-erg commissuralis interneuronok szerepével kapcsolatban a rágcsáló gerincvelőn végzett morfológiai kísérletek egymásnak ellentmondó eredményt adtak. Embrionális patkány gerincvelő ventromedialis szürkeállományának területén GAD és GABA immunoreaktív sejtesteket találtak, amelyek a ventralis commissurában kereszteződő axonnal rendelkeztek (Phelps és mtsai, 1999). A jelölt sejtek típusát TAG -1 (Transiently Expressed Axonal Glycoprotein) alkalmazásával tesztelték, mely a commissuralis axonok specifikus markerének tekinthető. Ezzel szemben embrionális egér és patkány lumbalis gerincvelőben a retrográdan jelölt interszegmentális CIN-ok esetében nem találtak GABA immunoreaktivitást (Nissen és mtsai, 2005).

A GABA szerepe a gerincvelő két oldala közti aktivitás szabályozásában meglehetősen vitatott. Fiziológusok a GABA gerincvelői motoros ritmusra kifejtett általános hatását vizsgálva újszülött patkány gerincvelőben, azt találták, hogy a GABA_A agonista muscimol vagy/és a GABA_B agonista baclofen alkalmazása a lumbalis gerincvelő motoros aktivitását lassítja, vagy akár teljesen meg is szünteti, míg a GABA_A antagonistá bicuculline és a GABA_B antagonistá phaclofen a gerincvelői motoros aktivitás frekvenciáját és amplitúdóját is növeli (Cazalets és mtsai, 1994). Más kísérletekben a gerincvelő L2-es szintjén lokálisan alkalmazott bicucullin nem befolyásolta az 5-HT és NMDA által kiváltott bal-jobb oldali alternációt (Kremer és Lev-Tov, 1997). Megint más vizsgálatokban viszont mind a glicin antagonistá strichnin, mind a GABA_A receptor antagonistá bicucullin vagy pikrotoxin használatakor a gerincvelői motoneuronokon megfigyelt alternáló aktivitás helyett a kétoldali motoneuronok együttes szinkron tüzelése volt megfigyelhető, ami arra

utal, hogy a glicinen kívül GABA_A receptorok is szerepet játszhatnak a bal-jobb oldali aktivitás koordinálásában (Cowley és Smith, 1995; Pflieger és mtsai, 2002).

Jól ismert, hogy a két fő gátló aminosav transzmitter a GABA és glicin az emlős gerincvelő axon terminálsaiban együttesen is megjelenhet (Todd és Sullivan, 1990; Shupliakov és mtsai, 1993; Örnung és mtsai, 1996). Mind patkány embrió (Gao és mtsai, 2001), mind újszülött patkány (Jonas és mtsai, 1998) motoneuronjain olyan szinapszisok meglétét igazolták, amelyek glicint és GABA-t egyaránt tartalmaztak. Fiziológusok kimutatták, hogy a GABA-t és glicint egyaránt felszabadító terminálisok egy gyors válaszú glicin mediált és egy lassú válaszú GABA_A-receptor mediált komponenssel rendelkeznek a posztzinaptikus motoneuronokban (Jonas és mtsai, 1998). Allain és mtsai (2006) vizsgálataiban embrionális patkány gerincvelő ventralis szürkeállományában lévő gátló neurotranszmittert tartalmazó neuronok közel 1/3-a bizonyult GABA-t és glicint is tartalmazó sejtnek.

Eredményeink azt mutatták, hogy a gátló CIN-ok is használhatják mindkét aminosavat, mivel a vizsgált CIN terminálisok 17%-ban a glicin és a GABA együttes előfordulását találtuk. E két gátló aminosav együttes jelenlétét egér lumbalis gerincvelői CIN-jaiban is igazolták, ahol az összes CIN mintegy 10%-a tartalmazta mindkét transzmittert. Felnőtt patkány interszegmentális CIN-jai esetében az összes jelölt CIN terminális mintegy 20%-ában e két gátló neurotranszmitter együtt volt jelen (Liu és mtsai, 2010). Ugyanakkor a glicin és GABA koexpressziójának relatíve alacsony volta azt sugallja, hogy a gátló transzmittereket használó CIN útvonalak jelentős része egymástól függetlenül működik (Restrepo és mtsai, 2009). Azt feltételezik, hogy az intraszegmentálisan projiciáló commissuralis interneuronok többsége glicinerg, míg a két gátló neurotranszmitter együttes előfordulása az interszegmentális CIN-ok esetében jelentős (Liu és mtsai, 2010).

Glicinerg és GABA-erg szinapszisok szelektív gátlása alacsony koncentrációjú strychnin és picrotoxin alkalmazásával arra utalt, hogy a glicin és a GABA más-más szerepet játszik a gerincvelő két oldala közti ritmus koordinálásában: a GABA-erg inhibíció a motoros ritmus kezdetét és időtartamát szabályozza, míg a glicin a bilaterális alternáló ritmus mintázatát stabilizálja (Hinckley és mtsai, 2005).

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Régóta ismert, hogy a gerincvelő egy olyan, központi ritmusgenerátornak (CPG) nevezett hálózatot tartalmaz, amely a magasabb motoros központoktól és a perifériáról érkező információk hiányában is képes a gerincvelői motoneuronok térben és időben összehangolt működésének létrehozására. A doktori értekezésben bemutatott munka során a CPG hálózat két tagját, a motoneuronokkal monoszinaptikusan kapcsolódó utolsó rendű premotor interneuronokat (LOPI) és a bal-jobb oldali alternáció létrehozásában alapvető commissuralis interneuronokat (CIN) vizsgáltuk morfológiai módszerekkel patkány lumbalis gerincvelőben.

Újszülött patkány gerincvelő lateralis motoros oszlopába adott BDA injekció után a jelölt LOPI-ok valamivel több, mint 80%-át az injekcióval azonos oldali V-VIII-as laminákban találtuk, de jelentős számban (18%) voltak jelölt sejtek contralateralisan is, mely utóbbi sejteket utolsó rendű commissuralis interneuronként (LOPCIN) definiálhatjuk. A LOPCIN-ok eloszlása a gerincvelő rostrocaudalis tengelye mentén egyenetlen volt, többségüket a L1-4-es szegmentumok területén találtuk, míg a L5-6-os szegmentumok csak kevés LOPCIN-t tartalmaztak. Elsőként írtuk le a primer afferensektől (PA) kontaktust fogadó LOPI-ok arányát, valamint lamináris és szegmentális megoszlását felnőtt patkány gerincvelőben. Kísérleteinkben a vizsgált LOPI-oknak csak töredéke (<10%) fogadott valószínűsíthető kontaktust primer afferens axon terminálisoktól. A kontaktust fogadó LOPI-ok többsége a kapcsolódó motoneuronokkal azonos szegmentumban, az V-VI-os laminák és a VII lamina dorsalis részén helyezkedett el.

Leírtuk, hogy a lateralis motoros oszlop motoneuronjainak közel 50%-a commissuralis interneuronoktól is fogad szoros appozíciókat. Az axoszomatikus és axodendritikus kapcsolatokat elektronmikroszkópos szinten is igazoltuk. Elsőként sikerült kimutatnunk a kétoldali CIN-ok közti kapcsolatok meglétét emlős gerincvelőben. Immunhisztokémiai módszerek alkalmazásával kimutattuk, hogy a CIN-ok valamivel több, mint negyede VGLUT1,2 immunoreaktív, azaz glutamáterg serkentő neuron lehet, míg 58%-uk gátló neurotranszmittert használ. A gátló terminálisok 76%-a glicinergnek, míg valamivel több, mint felük GAD65/67 immunopozitívnak bizonyult. A BDA jelölt gátló terminálisok 29%-a mindkét gátló transzmittert tartalmazta. Mindez arra utalhat, hogy emlős gerincvelőben a fiziológiai kísérletekben igazolt keresztezett glicinerg transzmisszió mellett gátló GABAerg és a serkentő glutamáterg CIN-ok is meghatározó szerepet játszhatnak a bal-jobb oldali koordináció létrehozásában.

Mivel vizsgálataink az alap kutatások körébe tartoznak, közvetlen gyakorlati hasznosításról nem beszélhetünk, eredményeink azonban hozzájárulhatnak a gerincvelői motoros működés pontosabb megértéséhez.

Morphological study of last-order premotor interneurons and commissural interneurons in the lumbar spinal cord of rats

Ildikó Wéber, Department of Anatomy, Histology and Embryology

University of Debrecen, Medical and Health Science Center, Hungary

SUMMARY

The basic motor patterns underlying rhythmic limb movements during locomotion are generated by neuronal networks located within the spinal cord. These networks are called central pattern generators (CPGs). We studied two elements of the CPG: last-order premotor interneurons that form monosynaptic contacts with motoneurons and commissural interneurons that coordinate activities between the left and right sides of the spinal cord.

After BDA injection into the lateral motor column of lumbar spinal cord of newborn rats about 80% of the labeled cells were located ipsilateral to the injection site and were confined to laminae V-VIII. We also recovered substantial number (18%) of labeled cells in the contralateral gray matter that were defined as last-order commissural interneurons (LOPCINs). We demonstrated that the distribution of LOPCINs is uneven along the rostrocaudal axis of the lumbar spinal cord. After injecting BDA into the motor column either at the L2 or L4 spinal segments, LOPCINs were labeled in large numbers at the level of L1-L4 but were recovered only in limited numbers at L5-L6. First in the literature we gave an account about the segmental and laminar distribution of LOPIs that receive monosynaptic inputs from primary afferents (PA). It was revealed that LOPIs contacted by PA terminals tend to be concentrated at the segmental level of the innervated motoneurons, and are evenly distributed along the mediolateral extent of laminae V-VI and in the dorsal portion of lamina VII. We described that only a minor proportion (<10%) of LOPIs were contacted by close appositions from stained primary afferents and received only a few (1-5) terminals.

We demonstrated that some CINs may establish monosynaptic contacts with motor neurons on the opposite side of the spinal cord. It has also been revealed that direct reciprocal connections between CINs on the two sides of the spinal cord may also exist. The immunoreactivity of BDA labeled CIN terminals for specific transmitter-associated proteins indicated that about one fourth of the CIN terminals could be excitatory and may use glutamate as a neurotransmitter whilst more than half of the CIN boutons (58%) assumed to be inhibitory. It was also found that 76% of the inhibitory CIN axon terminals may use glycine supporting that crossed glycinergic transmission plays a powerful function in the mammalian spinal cord. We also demonstrated that about half of the inhibitory terminals in neonatal spinal cord were labeled for GAD65/67 antibody indicating that GABAergic neurotransmission could also be involved in left-right coordination.

7. IRODALOMJEGYZÉK

Allain AE, Baïri A, Meyrand P, Branchereau P. 2004. Ontogenic changes of the GABAergic system in the embryonic mouse spinal cord. *Brain Res* 1000(1-2):134-147.

Allain AE, Baïri A, Meyrand P, Branchereau P. 2006. Expression of the glycinergic system during the course of embryonic development in the mouse spinal cord and its colocalization with GABA immunoreactivity. *J Comp Neurol*. 496(6):832-846.

Alvarez FJ, Jonas PC, Sapir T, Hartley R, Berrocal MC, Geiman EJ, Todd AJ, Goulding M. 2005. Postnatal phenotype and localization of spinal cord V1 derived interneurons. *J Comp Neurol* 493(2):177-192.

Angel MJ, Guertin P, Jiménez I, McCrea DA. 1996. Group I extensor afferents evoke disynaptic EPSP in cat hindlimb extensor motoneurons during fictive locomotion. *J Physiol* 494(3):851-861.

Angel MJ, Jankowska E, McCrea DA. 2005. Candidate interneurons mediating group I disynaptic EPSPs in extensor motoneurons during fictive locomotion in the cat. *J Physiol* 563(2):597-610.

Antal M, Polgár E. 1993. Development of calbindin-D28k immunoreactive neurons in the embryonic chick lumbosacral spinal cord. *Eur J Neurosci* 5(7):782-794.

Antal M, Polgár E, Berki AC, Puskár Z. 1994. Development of specific populations of interneurons in the ventral horn of the embryonic chick lumbosacral spinal cord. *Eur J Morphol*. 32(2-4):201-206.

Arshavsky YuI, Orlovsky GN, Panchin YuV, Roberts A, Soffe SR. 1993. Neuronal control of swimming locomotion: analysis of the pteropod mollusc *Clione* and embryos of the amphibian *Xenopus*. *Trends Neurosci* 16(6):227-233.

Bannatyne BA, Edgley SA, Hammar I, Jankowska E, Maxwell DJ. 2003. Networks of inhibitory and excitatory commissural interneurons mediating crossed reticulospinal axons. *Eur J Neurosci* 18(8):2273-2284.

Barajon I, Gossard JP, Hultborn H. 1992. Induction of fos expression by activity in the spinal rhythm generator for scratching. *Brain Res*. 588(1):168-172.

Barry M, 'O Donovan MJ. 1987. The effects of excitatory amino acids and their antagonists on the generation of motor activity in the isolated chick cord. *Dev. Brain Res*. 36:271-276.

Beato M, Nistri A. 1999. Interaction between disinhibited bursting and fictive locomotor patterns in the rat isolated spinal cord. *J Neurophysiol* 82(5):2029-2038.

Berki AC, O'Donovan MJ, Antal M. 1995. Developmental expression of glycine immunoreactivity and its colocalisation with GABA in the embryonic chick lumbosacral spinal cord. *J Comp Neurol*. 362(4):583-596.

- Berkowitz A. 2004. Propriospinal projections to the ventral horn of the rostral and caudal hindlimb enlargement in turtles. *Brain Res* 1014(1-2):164-176.
- Bernhardt RR, Chitnis AB, Lindamer L, Kuwada JY. 1990. Identification of spinal neurons in the embryonic and larval zebrafish. *J Comp Neurol.* 302(3):603-616.
- Bonnot A, Whelan PJ, Mentis GZ, O'Donovan MJ. 2002. Locomotor-like activity generated by the neonatal mouse spinal cord. *Brain Res Rev* 40(1-3):141-151.
- Briscoe J, Sussel L, Serup P, Hartigan-O'Connor D, Jessel TM, Rubenstein JL, Ericson. 1999. Homeobox gene Nkx2.2 and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling. *Nature* 398(6728):622-627.
- Brown AG, Fyffe RE. 1981. Direct observations on the contacts made between Ia afferent fibres and alpha-motoneurons in the cat's lumbosacral spinal cord. *J Physiol* 313:121-140.
- Buchanan JT. 1982. Identification of interneurons with contralateral, caudal axons in the lamprey spinal cord: synaptic interactions and morphology. *J Neurophysiol* 47(5):961-975.
- Buchanan JT, Kasicki S. 1999. Segmental distribution of common synaptic inputs to spinal motoneurons during fictive swimming in the lamprey. *J Neurophysiol* 82(3):1156-1163.
- Buchanan JT, McPherson DR. 1995. The neuronal network for locomotion in the lamprey spinal cord: evidence for the involvement of commissural interneurons. *J Physiol Paris* 89(4-6):221.233.
- Burke RE, Degtyarenko AM, Simon ES. 2001. Patterns of locomotor drive to motoneurons and last-order interneurons: clues to the structure of the CPG. *J Neurophysiol* 086(1):447-462.
- Butt SJ, Harris-Warrick RM, Kiehn O. 2002. Firing properties of identified interneuron populations in the mammalian hindlimb central pattern generator. *J Neurosci* 22(22): 9961-71.
- Butt SJ, Kiehn O. 2003. Functional identification of interneurons responsible for left-right coordination of hindlimbs in mammals. *Neuron* 38(6):953-963.
- Butt SJ, Lundfald L, Kiehn O. 2005. Eph4 defines a class of excitatory locomotor-related interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(39):14098-14103.
- Carlin KP, Dai Y, Jordan LM. 2006. Cholinergic and serotonergic excitation of ascending commissural neurons in the thoraco-lumbar spinal cord of the neonatal mouse. *J Neurophysiol.* 95(2):1278-84.
- Casalets JR, Bertrand S. 2000. Coupling between lumbar and sacral motor networks in the neonatal rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 12:2993-3002.
- Casalets JR, Borde M, Clarac F. 1996. The synaptic drive from the spinal locomotor network to motoneurons in the newborn rat. *J Neurosci* 16(1):298-306.

- Casalets JR, Squalli-Houssaini Y, Clarac F. 1994. GABAergic inactivation of the central pattern generators for locomotion in isolated neonatal rat spinal cord. *J Physiol* 474(1):173-81.
- Cavallari P, Edgley SA, Jankowska E. 1987. Post-synaptic actions of midlumbar interneurons on motoneurons of hind-limb muscles in the cat. *J Physiol* 389:675-689.
- Christie KJ, Whelan PJ. 2005. Monoaminergic establishment of rostrocaudal gradients of rhythmicity in the neonatal mouse spinal cord. *J Neurophysiol* 94(2):1554-1564.
- Clarac F, Pearlstein E, Pflieger JF, Vinay L. 2004. The in vitro neonatal rat spinal cord preparation: a new insight into mammalian locomotor mechanism. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 190(5):343-357.
- Cowley KC, Schmidt BJ. 1995. Effects of inhibitory amino acid antagonists on reciprocal inhibitory interactions during rhythmic motor activity in the in vitro neonatal rat spinal cord. *J Neurophysiol* 74:1109-1117.
- Cowley KC, Schmidt BJ. 1997. Regional distribution of the locomotor pattern-generating network in the neonatal rat spinal cord. *J Neurophysiol* 77(1):247-259.
- Czarkowska J, Jankowska E, Sybirska E. 1981. Common interneurons in reflex pathways from group Ia and Ib afferents of knee flexors and extensors in the cat. *J Physiol* 310:367-380.
- Dai X, Noga BR, Douglas JR, Jordan LM. 2005. Localization of spinal neurons activated during locomotion using the c-fos immunohistochemical method. *J Neurophysiol* 93(6):3442-3452.
- Dale N. 1985. Reciprocal inhibitory interneurons in the *Xenopus* embryo spinal cord. *J Physiol* 363:61-70.
- Dale N. 1986. Excitatory synaptic drive for swimming mediated by amino acid receptors in the lamprey. *J Neurosci.* 6(9): 2662-2675.
- Dale N, Roberts A. 1985. Dual-component amino-acid-mediated synaptic potentials: Excitatory drive for swimming in *Xenopus* embryos. *J Physiol* 363: 35-59.
- Degtyarenko AM, Simon ES, Burke RE. 1996. Differential modulation of disynaptic cutaneous 2inhibition and excitation in ankle flexor motoneurons during fictive locomotion. *J Neurophysiol* 76(5):2972-2985.
- Degtyarenko AM, Simon ES, Norden-Krichmar T, Burke RE. 1998. Modulation of oligosynaptic cutaneous and muscle afferent reflex pathways during fictive locomotion and scratching in the cat. *J Neurophysiol* 79(1):447-463.
- Delcomyn F. 1980. Neural basis of rhythmic behaviour in animals. *Science.* 210(4469):492-498.

Deliagina TG, Orlovsky GN, Pavlova GA. 1983. The capacity for generation of rhythmic oscillations is distributed in the lumbosacral spinal cord of the cat. *Exp Brain Res* 53(1): 81-90.

Dottori M, Hartley L, Galea M, Paxinos G, Polizzotto M, Kilpatrick T, Bartlett PF, Murphy M, Köntgen F, Boyd AW. 1998. Eph4 (Sek1) receptor tyrosine kinase is required for the development of the corticospinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(22):13248-13253.

Edgley SA. 2001. Organization of inputs to spinal interneuron population. *J Physiol* 533(1):51-56.

Edgley SA, Jankowska E. 1987. An interneuronal relay for group I and II muscle afferents in the midlumbar segments of the cat spinal cord. *J Physiol* 389:647-674.

Eide AL, Glover J, Kjaerulff O, Kiehn O. 1999. Characterization of commissural interneurons in the lumbar region of the neonatal rat spinal cord. *J Comp Neurol* 403(3):332-345.

Fleshman JW, Lev-Tov A, Burke RE. 1984. Peripheral and central control of flexor digitorum longus and flexor hallucis longus motoneurons: the synaptic basis of functional diversity. *Exp Brain Res* 54(1):133-49.

Fleshman JW, Rudomin P, Burke RE. 1988. Supraspinal control of a short-latency cutaneous pathway to hindlimb motoneurons. *Exp Brain Res* 69(3):449-59.

Fremeau RT Jr, Troyer MD, Pahner I, Nygaard GO, Tran CH, Reimer RJ, Bellocchio EE, Storm-Mathisen J, Edwards RH. 2001. The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapses. *Neuron* 31(2): 247-260.

Fremeau RT Jr, Voglmaier S, Seal RP, Edwards RH. 2004. VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel role of glutamate. *Trends Neurosci* 27(2):98-103.

Gao BX, Stricker C, Ziskind-Conhaim L. 2001. Transition from GABAergic to glycinergic synaptic transmission in newly formed spinal networks. *J Neurophysiol* 86(1):492-502.

Geiman EJ, Zheng W, Fritschy JM, Alvarez FJ. 2002. Glycine and GABA(A) receptor subunits on Renshaw cells: relationship with presynaptic neurotransmitters and postsynaptic gephyrin clusters. *J Comp Neurol* 444(3):275-289.

Gosgnach S, Lanuza GM, Butt SJ, Saueressig H, Zhang Y, Velasquez T, Riethmacher D, Callaway EM, Kiehn O, Goulding M. 2006. V1 spinal neurons regulate the speed of vertebrate locomotor outputs. *Nature* 440(7081):215-219.

Graham Brown TG. 1911. The intrinsic factors in the act of progression in the mammal. *Proc R Soc Lond* 84:308-319.

Gray PA, Rekling JC, Bocchiaro CM, Feldman JL. 1999. Modulation of respiratory frequency by peptidergic input to rhythmogenic neurons in the pre-Bötzinger complex. *Science* 286(5444): 1566-1568.

- Gray PA, Janczewsky WA, Mellen N, McCrimmon DR, Feldmann JL. 2001. Normal breathing requires preBötzing complex neurokinin-1 receptor-expressing neurons. *Nat Neurosci* 4(9):927-930.
- Grillner S. 1985. Neurobiological bases of rhythmic motor acts in vertebrates. *Science* 228(4696):143-149.
- Grillner S. 2003. The motor infrastructure: from ion channels to neuronal networks. *Nat Rev Neurosci* 4(7):573.
- Grillner S, Deliagina T, Ekeberg O, elManira A, Hill RH, Lansner A, Orlovsky GN, Wallén P. 1995. Neural networks that co-ordinate locomotion and body orientation in lamprey. *Trends Neurosci* 18(6):270-279.
- Grillner S, Hongo T. 1972. Vestibulospinal effects on motoneurons and interneurons in the lumbosacral cord. *Prog Brain Res* 37:243-262.
- Grillner S, Wallén P. 2002. Cellular bases of a vertebrate locomotor system-steering, intersegmental and segmental co-ordination and sensory control. *Brain Res Rev* 40:92-106.
- Grillner S, Zanger P. 1979. On the central generation of locomotion in the low spinal cat. *Exp Brain Res*. 34(2):241-261.
- Guertin P, Angel MJ, Perreault MC, McCrea DA. 1995. Ankle extensor group I afferents excite extensors throughout the hindlimb during fictive locomotion in the cat. *J Physiol* 487(1):197-209.
- Hammar I, Bannatyne BA, Maxwell DJ, Edgley SA, Jankowska E. 2004. The actions of monoamines and distribution of noradrenergic and serotonergic contacts on different subpopulations of commissural interneurons in the cat spinal cord. *Eur J Neurosci* 19(5):1305-1316.
- Harrison PJ, Jankowska E, Zytnicki D. 1986. Lamina VIII interneurons interposed in crossed reflex pathways in the cat. *J Physiol* 371:147-166.
- Hinckley C, Seebach B, Ziskind-Conhaim L. 2005. Distinct roles of glycinergic and GABAergic inhibition in coordinating locomotor-like rhythms in the neonatal mouse spinal cord. *Neuroscience* 130(3):745-758.
- Ho S, 'O Donovan. 1993. Regionalization and inter-segmental coordination of rhythm generating networks in the spinal cord of the chick embryo. *J. Neurosci* 13:1354-1371.
- Hongo T, Kitazawa S, Ohki Y, Sasaki M, Xi MC. 1989. A physiological and morphological study of premotor interneurons in the cutaneous reflex pathways in cats. *Brain Res* 505(1):163-166.
- Jankowska E. 1992. Interneuronal relay in spinal pathways from proprioceptors. *Prog Neurobiol* 38(4):335-378.

- Jankowska E. 1985. Further indications for enhancement of retrograde transneuronal transport of WGA-HRP by synaptic activity. *Brain Res* 341(2):403-408.
- Jankowska E. 2001. Spinal interneuronal systems: identification multifunctional character and reconfigurations in mammals. *J Physiol* 533(1):31-40.
- Jankowska E, Hammar I, Slawinska U, Maleszak K, Edgley SA. 2003. Neuronal basis of crossed actions from the reticular formation on feline hindlimb motoneurons. *J Neurosci* 23(5):1867-1878.
- Jankowska E, Krutki P, Matsuyama K. 2005. Relative contribution of Ia inhibitory interneurons to inhibition of feline contralateral motoneurons evoked via commissural interneurons. *J Physiol* 568(2):617-628.
- Jankowska E, Noga BR. 1990. Contralaterally projecting lamina VIII interneurons in middle lumbar segments in the cat. *Brain Res* 535(2):327-330.
- Jankowska E, Skoog B. 1986. Labelling of midlumbar neurones projecting to cat hindlimb motoneurons by transneuronal transport of a horseradish peroxidase conjugate. *Neurosci Lett* 71(2):163-168.
- Jankowska E, Zytnicki D. 1985. Comparison of group I non-reciprocal inhibition of individual motoneurons of a homogeneous population. *Brain Res* 329(1-2):379-83.
- Jonas P, Bischofberger J, Sandkühler J. 1998. Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse. *Science* 281(5375):360-361.
- Jordan LM, Schmidt BJ. 2002. Propriospinal neurons involved in the control of locomotion: potential targets for repair strategies? *Prog Brain Res* 137:125-139.
- Juvin L, Simmers J, Morin D. 2005. Propriospinal circuitry underlying interlimb coordination in mammalian quadrupedal locomotion. *J Neurosci* 25(25):6025-6035.
- Kaufman DL, Houser CR, Tobin AJ. 1991. Two forms of the gamma-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct interneuronal distributions and cofactor interactions. *J Neurochem* 56(2):720-723.
- Kiehn O. 2006. Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annu Rev Neurosci* 29:279-306.
- Kiehn O. 2011. Development and functional organization of spinal locomotor circuits. *Curr Opin Neurobiol* 21(1):100-9.
- Kiehn O, Dougherty KJ, Hägglund M, Borgius L, Talpalar A, Restrepo CE. 2010. Probing spinal circuits controlling walking in mammals. *Biophys and Biochem Res Communications* 396:11-18.
- Kiehn O, Kjaerulff O. 1996. Spatiotemporal characteristics of 5-HT and dopamine-induced rhythmic hindlimb activity in the in vitro neonatal rat. *J Neurophysiol* 75(4):1472-1482.

- Kiehn O, Kjaerulff O. 1998. Distribution of central pattern generators for rhythmic motor outputs in the spinal cord of limbed vertebrates. *Ann N Y Acad Sci* 860:110-29.
- Kiehn O, Quinlan KA, Restrepo CE, Lundfald L, Borgius L, Talpalar AE, Endo T. 2008. Excitatory components of the mammalian locomotor CPG. *Brain Res Rev* 57(1): 56-63.
- Kjaerulff O, Barajon I, Kiehn O. 1994. Sulphorhodamine-labelled cells in the neonatal rat spinal cord following chemically induced locomotor activity in vitro. *J Physiol.* 478.2:265-273.
- Kjaerulff O, Kiehn O. 1996. Distribution of networks generating and coordinating locomotor activity in the neonatal rat spinal cord in vitro: a lesion study. *J Neurosci* 16(18):5777-5794.
- Kjaerulff O, Kiehn O. 1997. Crossed rhythmic synaptic input to motoneurons during selective activation of the contralateral spinal locomotor network. *J Neurosci* 17(24):9433-9447.
- Kremer E, Lev-Tov A. 1997. Localization of the spinal network associated with generation of hindlimb locomotion in the neonatal rat and organization of its transverse coupling system. *J Neurophysiol* 77(3):1155-1170.
- Kudo N, Yamada T. 1987. N.methyl-D,L-aspartate-induced locomotor activity in a spinal cord-hindlimb muscles preparation of the newborn rat studied in vitro. *Neurosci Lett* 75(1):43-48.
- Kullander K, Butt SJ, Le Bret JM, Lundfald L, Restrepo CE, Rydström A, Klein R, Kiehn O. 2003. Role of EphA4 and EphrinB3 in local neuronal circuits that control walking. *Science* 299(5614):1889-1892.
- Lafreniere-Roula M, McCrea DA. 2005. Deletions of rhythmic motoneuron activity during fictive locomotion and scratch provide clues to the organization of the mammalian central pattern generator. *J Neurophysiol* 94(2):1120-1132.
- Lanuza GM, Gosgnach S, Pierani A, Jessel TM, Goulding M. 2004. Genetic identification of spinal interneurons that coordinate left-right locomotor activity necessary for walking movements. *Neuron* 42(3):375-386.
- Li WC, Higashijima S, Parry DM, Roberts A, Soffe SR. 2004. Primitive roles for inhibitory interneurons in developing frog spinal cord. *J Neurosci* 24(25):5840-5848.
- Li WC, Sautois B, Roberts A, Soffe SR. 2007. Reconfiguration of a vertebrate motor network: specific neuron recruitment and context-dependent synaptic plasticity. *J Neurosci* 27(45): 12267-12276.
- Liu TT, Bannatyne BA, Maxwell DJ. 2010. Organization and neurochemical properties of intersegmental interneurons in the lumbar enlargement of the adult rat. *Neuroscience* 171:461-484.

- Mackie M, Hughes DI, Maxwell DJ, Tillakaratne NJ, Todd Aj. 2003. distribution and colocalization of glutamate decarboxylase isoforms in the rat spinal cord. *Neuroscience* 119(2):461-472.
- Mahmood R, C.E. Restrepo CE, El Manira A. 2009. Transmitter phenotypes of commissural interneurons in the lamprey spinal cord. *Neuroscience* 164(3):1057-1067.
- Matsushita M. 1970. The axonal pathways of spinal neurons in the cat. *J Comp Neurol* 138(4):391-417.
- Matsuyama K, Nakajima K, Mori F, Aoki M, Mori S. 2004. Lumbar commissural interneurons with reticulospinal inputs in the cat: morphology and discharge patterns during fictive locomotion. *J Comp Neurol* 474(4):546-561.
- McCrea DA, Pratt CA, Jordan LM. 1980. Renshaw cell activity and recurrent effects on motoneurons during fictive locomotion. *J Neurophysiol* 44(3):475-488.
- McCrea DA, Shefchyk SJ, Stephens MJ, Pearson KG. 1995. Disynaptic group I excitation of synergist ankle extensor motoneurons during fictive locomotion in the cat. *J Physiol* 487(2):527-539.
- Mentel T, Cangiano L, Grillner S, Büschges A. 2008. Neuronal substrates for state-dependent changes in coordination between motoneuron pools during fictive locomotion in the lamprey spinal cord. *J Neurosci* 28(4):868-879.
- Mortin LI, Stein PS. 1989. Spinal cord segments containing key elements of the central pattern generators for three forms of scratch reflex in the turtle. *J Neurosci* 9(7):2285-2296.
- Moschovakis AK, Solodkin M, Burke RE. 1992. Anatomical and physiological study of interneurons in an oligosynaptic cutaneous reflex pathway in the cat hindlimb. *Brain Res* 586(2):311-318.
- Nakayama K, Nishimaru H, Kudo N. 2002. Basis of changes in left-right coordination of rhythmic motor activity during development in the rat spinal cord. *J Neurosci* 22(23):10388-10398.
- Nishimaru H, Restrepo CE, Kiehn O. 2006. Activity of Renshaw cells during locomotor-like rhythmic activity in the isolated spinal cord of neonatal mice. *J Neurosci* 26(20):5320-5328.
- Nishimaru H, Kudo N. 2000. Formation of the central pattern generator for locomotion in the rat and mouse. *Brain Res Bull* 53(5):661-669.
- Nissen UV, Mochida H, Glover JC. 2005. Development of projection-specific interneurons and projection neurons in the embryonic mouse and rat spinal cord. *J Comp Neurol* 483(1):30-47.
- Noga BR, Shefchyk SJ, Jamal J, Jordan LM. 1987. The role of Renshaw cells in locomotion: antagonism in their excitation from motor axon collaterals with intravenous mecamylamine. *Exp Brain Res* 66(1):99-105.

- Norreel JC, Pflieger JF, Pearlstein E, Simeoni-Alias J, Clarac F, Vinay L. 2003. Reversible disorganization of the locomotor pattern after neonatal spinal cord transaction in the rat. *J Neurosci* 23(5):1924-1932.
- Otsuka M, Konishi S. 1974. Electrophysiology of mammalian spinal cord in vitro. *Nature* 252:733-734.
- Örnung G, Shupliakov O, Lindä H, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Ulfhake B, Culheim S. 1996. Qualitative and quantitative analysis of glycine- and GABA-immunoreactive nerve terminals on motoneuron cell bodies in the cat spinal cord: a postembedding electron microscopic study. *J Comp Neurol* 365(3):413-426.
- Perret C, Cabelguen JM, Orsal D. 1988. Analysis of the pattern of activity in “knee flexor” motoneurons during locomotion in the cat. In: Gurfinkle VS, Ioffe ME, Massion J, Roll JP (Eds.). *Stance in motion: Facts and Concepts*. Plenum Press, New York:133-141.
- Pflieger JF, Clarac F, Vinay L. 2002. Picrotoxin and bicuculline have different effects on lumbar spinal networks and motoneurons in the neonatal rat. *Brain Res* 953(1-2):81-86.
- Phelps PE, Alijani A, Tran TD. 1999. Ventrally located commissural neurons express the GABAergic phenotype in the developing rat spinal cord. *J Comp Neurol*. 409(2):285-298.
- Pierani A, Moran-Rivard L, Sunshine MJ, Littman DR, Goulding M, Jessel TM. 2001. Control of interneuron fate in the developing spinal cord by the homeodomain protein Dbx1. *Neuron* 29(2):367-384.
- Pratt CA, Jordan LM. 1987. Ia inhibitory interneurons and Renshaw cells as contributors to the spinal mechanism of fictive locomotion, *J Neurophysiol* 57(1):56-71.
- Puskár Z, Antal M. 1997. Localization of last-order premotor interneurons in the lumbar spinal cord of rats. *J Comp Neurol* 389(3):377-389.
- Quevedo J, Fedirchuk B, Gosgnach S, McCrea DA. 2000. Group I disynaptic excitation of cat hindlimb flexor and bifunctional motoneurons during fictive locomotion. *J Physiol* 525(2):549-564.
- Quinlan KA, Kiehn O. 2007. Segmental, synaptic actions of commissural interneurons in the mouse spinal cord. *J Neurosci* 27(24):6521-6530.
- Rajakumar N, Elisevich K, Flumerfelt BA. 1993. Biotinylated dextran: a versatile anterograde and retrograde neuronal tracer. *Brain Res* 607(1-2):47-53.
- Ramon y Cajal. 1909. *Histologie du système nerveux de l’homme et des vertébrés*. A Paris: Moiné 1: 93.
- Reetz A, Solimena M, Matteoli M, Folli F, Takei K, DeCamilli P. 1991. GABA and pancreatic beta-cells: colocalization of glutamic acid decarboxylase (GAD) and GABA with synaptic-like microvesicles suggest their role in GABA storage and secretion. *EMBO J* 10(5):1275-1284.

- Restrepo CE, Lundfald L, Szabó G, Erdélyi F, Zeilhofer HU, Glover JC, Kiehn O. 2009. Transmitter-phenotypes of commissural interneurons in the lumbar spinal cord of newborn mice. *J Comp Neurol* 517:177-192.
- Roberts A. 1990. How does a nervous system produce behaviour? A case study in neurobiology. *Sci Prog* 74(1):31-51.
- Roberts a, Alford ST. 1986. Descending projections and excitation during fictive swimming in *Xenopus* embryos: neuroanatomy and lesion experiments. *J Comp Neurol* 250(2):253-261.
- Roberts A, Soffe SR, Wolf ES, Yoshida M, Zhan FY. 1998. Central circuits controlling locomotion in young frog tadpoles. *Ann N Y Acad Sci.* 860:19-34.
- Rybak IA, Shevtsova NA, Lafreniere-Roula M, McCrea DA. 2006. Modelling spinal circuitry involved in locomotor pattern generation: insights from deletions during fictive locomotion. *J Physiol* 577(2):617-639.
- Rybak IA, Stecina K, Shevtsova NA, McCrea DA. 2006. Modelling spinal circuitry involved in locomotor pattern generation: insights from the effects of afferent stimulation. *J Physiol* 577(2):641-658.
- Sapir T, Geiman EJ, Wang Z, Velasquez T, Mitsui S, Yoshihara Y, Frank E, Alvarez FJ, Goulding M. 2004. Pax6 and engrailed 1 regulate two distinct aspects of rensaw cell development. *J Neurosci* 24(5):1255-1264.
- Scheibel ME, Scheibel AB. 1969. Terminal patterns in cat spinal cord. 3.Primary afferent collaterals. *Brain Res* 13(3):417-43.
- Schmidt BJ, Jordan LM. 2000. The role of serotonin in reflex modulation and locomotor rhythm production in the mammalian spinal cord. *Brain Res Bull* 53(5):689-710.
- Schmidt BJ, Meyers DE, Tokuriki M, Burke RE. 1989. Modulation of short latency cutaneous excitation in flexor and extensor motoneurons during fictive locomotion in the cat. *Exp Brain Res* 77(1):57-68.
- Selverston AI. 1977. Neural circuitry underlying oscillatory motor output. *J Physiol.* 73(4):463-470.
- Shefchyk S, McCrea D, Kriellaars D, Fortier P, Jordan L. 1990. Activity of interneurons within the L4 spinal segment of the cat during brainstem-evoked fictive locomotion. *Exp Brain Res* 80(2):290-292.
- Shupliakov O, Ornung G, Brodin L, Ulfhake B, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Cullheim S. 1993. Immunocytochemical localization of amino acid neurotransmitter candidates in the ventral horn of the cat spinal cord: a light microscopic study. *Exp Brain Res* 96(3):404-408.
- Sidibé M, Smith Y. 1996. Differential synaptic innervation of striatofugal neurones projecting to the internal or external segments of the globus pallidus by thalamic afferents in the squirrel monkey. *J Comp Neurol* 365(3):445-465.

- Sillar KT, Roberts A. 1988. A neuronal mechanism for sensory gaiting during locomotion in a vertebrae. *Nature* 331:262-265.
- Silos-Santiago I, Snider WD. 1992. Development of commissural neurons in the embryonic rat spinal cord. *J Comp Neurol* 325(4):514-526.
- Silos-Santiago I, Snider WD. 1994. Development of interneurons with ipsilateral projections in embryonic rat spinal cord. *J Comp Neurol*. 342(2):221-231.
- Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, Feldman JL. 1991. Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science*. 254(5032):726-729.
- Smith JC, Feldman JL. 1987. In vitro brainstem-spinal cord preparations for study of motor systems for mammalian respiration and locomotion. *J Neurosci Methods* 21:321-333.
- Soffe SR. 1989. Roles of glycinergic inhibition and N-Methyl-D-Aspartate receptor mediated excitation in the locomotor rhythmicity of one half of the *Xenopus* embryo central nervous system. *Eur J Neurosci* 1(6):561-571.
- Soffe SR, Zhao FY, Roberts A. 2001. Functional projection distances of spinal interneurons mediating reciprocal inhibition during swimming in *Xenopus* tadpoles. *Eur J Neurosci* 13(3):617-627.
- Soghomonian JJ, Martin DL. 1998. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol Sci* 19(12):500-505.
- Spike RC, Watt C, Zafra F, Todd AJ. 1997. An ultrastructural study of the glycine transporter GLYT2 and its association with glycine in the superficial laminae of the rat spinal dorsal horn. *Neurosci* 77(2):543-551.
- Stein PS. 2005. Neuronal control of turtle hindlimb motor rhythms. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 191(3):213-229.
- Stokke MF, Nissen UV, Glover JC, Kiehn O. 2002. Projection patterns of commissural interneurons in the lumbar spinal cord of the neonatal rat. *J Comp Neurol* 446(4):349-359.
- Szentágothai J. 1951. Short propriospinal neurons and intrinsic connections of the spinal gray matter. *Acta Morphol Acad Sci Hungar* 1:81-84.
- Todd AJ, Hughes DI, Polgár E, Nagy GG, Mackie M, Ottersen OP, Maxwell DJ. 2003. The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn. *Eur J Neurosci* 17(1):13-27.
- Todd AJ, Sullivan AC. 1990. Light microscope study of the coexistence of GABA-like and glycine-like immunoreactivities in the spinal cord of the rat. *J Comp Neurol*. 296(3):496-505.
- Tran TS, Alijani A, Phelps PE. 2003. Unique developmental patterns of GABAergic neurons in rat spinal cord. *J Comp Neurol*. 456(2):112-126.

- Yoshida M, Roberts A, Soffe SR. 1998. Axon projections of reciprocal inhibitory interneurons in the spinal cord of young *Xenopus* tadpoles and implications for the pattern of inhibition during swimming and struggling. *J Comp Neurol* 400(4):504-518.
- Varoqui H, Schäfer MK, Zhu H, Weihe E, Ericson JD. 2002. Identification of the differentiation-associated Na⁺/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *J Neurosci* 22(1):142-155.
- Veenman CL, Honig MG. 1992. Biotinylated dextran amine as an anterograde tracer for single-and double-labeling studies. *J Neurosci Meth* 41(3):239-54.
- Willis W, Willis JC. 1966. Properties of interneurons in the ventral spinal cord. *Arch Ital Biol* 104:354-386.
- Wilson JM, Hartley R, Maxwell DJ, Todd AJ, Lieberam I, Kaltschmidt JA, Yoshida Y, Jessel TM, Brownstone RM. 2005. Conditional rhythmicity of ventral spinal interneurons defined by expression of the Hb9 homeodomain protein. *J Neurosci* 25(24):5710-5719.
- Wu WL, Ziskind-Conhaim L, Sweet MA. 1992. Early development of glycine-and GABA-mediated synapses in rat spinal cord. *J Neurosci* 12(10):3935-3945.
- Zafra F, Gomeza J, Olivares L, Aragón C, Giménez C. 1995. Regional distribution and developmental variation of the glycine transporters GLYT1 and GLYT2 in the rat CNS. *Eur J Neurosci* 7(6):1342-1352.
- Zhong G, Díaz-Ríos M, Harris-Warrick RM. 2006. Intrinsic and functional differences among commissural interneurons during fictive locomotion and serotonergic modulation in the neonatal mouse. *J Neurosci* 26(24):6509-6517.

8. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK/279/2012.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Wéber Ildikó

Neptun kód: I1BVJX

Doktori Iskola: Idegtudományi Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Wéber, I.**, Veress, G., Szűcs, P., Antal, M., Birinyi, A.: Neurotransmitter systems of commissural interneurons in the lumbar spinal cord of neonatal rats.
Brain Res. 1178, 65-72, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2007.06.109>
IF:2.218
2. **Wéber, I.**, Puskár, Z., Kozák, N., Antal, M.: Projections of primary afferent fibers to last-order premotor interneurons in the lumbar spinal cord of rats.
Brain Res. Bull. 71 (4), 337-343, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2006.10.003>
IF:1.943
3. Birinyi, A., Viszokay, K., **Wéber, I.**, Kiehn, O., Antal, M.: Synaptic targets of commissural interneurons in the lumbar spinal cord of neonatal rats.
J. Comp. Neurol. 461 (4), 429-440, 2003.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cne.10696>
IF:3.672



További Közlemények

4. Stelescu, A., Sümegi, J., **Wéber, I.**, Birinyi, A., Wolf, E.: Somato-dendritic morphology and dendritic signal transfer properties differentiate between fore- and hindlimb innervating motoneurons in the frog *Rana esculenta*.

BMC Neurosci. 13 (1), 68, 2012.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2202-13-68>

IF:3.042 (2011)

Összesített impakt faktor: 10.875

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 7.833

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.09.19



Az értekezés témájához kapcsolódó kongresszusi absztraktok:

I. Wéber, Z. Puskár, N. Kozák, M. Antal. 2001. Termination of primary afferent fibers and corticospinal pathways on last-order premotor interneurons in the lumbar spinal cord of rats. Eight Annual Meeting of HNS, p277.

A. Birinyi, A. Kjaer, K. Vizsokay, **I. Wéber**, O. Kiehn, M. Antal. 2001. Synaptic targets of commissural interneurons in the lumbar spinal cord of the neonatal rat. Soc. Neurosci. Abstr. 26:722.11.

A. Birinyi, K. Vizsokay, **I. Wéber**, O. Kiehn, M. Antal. 2002. Distribution, morphology and synaptic targets of commissural interneurons in the lumbar spinal cord of neonatal rats. Abstracts of IBRO Meeting p.292.

I. Wéber, G. Veress, P. Szűcs, Gy. Vereb, M. Antal, A. Birinyi. 2006. Neurotransmitters of commissural interneurons in the lumbar spinal cord of neonatal rats. Clinical Neuroscience 59. 12.

Egyéb kongresszusi absztraktok:

I. Wéber, A. Birinyi, O. Shupliakov, M. Antal. 2004. Colocalization of zinc with GABA and glycine in the spinal cord. Clinical Neuroscience 57/1: 72.

E. Wolf, A. Stelescu, **I. Wéber**, A. Dityatev, A. Birinyi. 2004. Postsynaptic factors that may control size of propriospinal single fibre EPSPs in lumbar motoneurons of frogs. SYMBIONIC, Computational Systems Biology of the Neural Cell, Trieste, Italy.

E. Wolf, A. Stelescu, **I. Wéber**, A. Dityatev, A. Birinyi. 2004. Non-linear summation of postsynaptic potentials and morphoelectrotonic differences in positions of synaptic contacts differentiate propriospinal synapses with small and large amplitudes of EPSPs in lumbar motoneurons of frogs. FENS Abstr. A058.19, Lisbon.

E. Wolf, A. Stelescu, **I. Wéber**, A. Dityatev, A. Birinyi. 2004. Thorns and non-linear summation of postsynaptic potentials as factor that control the mean amplitude of single-fiber propriospinal EPSPs in lumbar motoneurons of frog. Clinical Neuroscience 57/1: 73.

A. Stelescu, **I. Wéber**, A. Dityatev, A. Birinyi, E. Wolf. 2006. Factors that may control size of propriospinal single fibre EPSPs in lumbar motoneurons of frogs. Clinical Neuroscience 59: 56.

A. Stelescu, E. Vida, **I. Wéber**, A. Birinyi, E. Wolf. 2007. An analysis of geometrical and functional distributions of reticulospinal and propriospinal synapses received by motoneurons of frog (*Rana esculenta*). Clinical Neuroscience 60: 60.

A. Stelescu, E. Vida, **I. Wéber**, A. Birinyi, E. Wolf. 2008. Cervical and lumbar motoneurons are morphologically and electrotonically different in frog (*Rana esculenta*). *Clinical Neuroscience* 61: 59.

E. Vida, A. Stelescu, **I. Wéber**, A. Dityatev, E. Wolf, A. Birinyi. 2008. Quantitative morphological description of reticulospinal interneuron-motoneuron connections in the cervical spinal cord of frog. *Clinical Neuroscience* 61: 68.

I. Wéber, A. Stelescu, A. Dityatev, E. Wolf, A. Birinyi. 2008. Quantitative morphological description of electron microscopically identified propriospinal interneuron – motoneuron connections in the lumbar spinal cord of frog. *FENS Abstr.* vol.4: 156.7.

A. Stelescu, E. Vida, **I. Wéber**, A. Birinyi, E. Wolf. 2008. Segmental differences between cervical and lumbar motoneurons in the spinal cord of frogs. *FENS Abstr.* vol.4: 156.5.

9. TÁRGYSZAVAK

központi ritmusgenerátor, utolsó rendű premotor interneuron, commissuralis interneuron, primer afferens, motoneuron, immunhisztokémia, neurotranszmitterek

Keywords: central pattern generator, last-order premotor interneuron, commissural interneuron, primary afferent, motoneuron, immunohistochemistry, neurotransmitters

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Kutatásaimat a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetében végeztem. Szeretném megköszönni az Intézet korábbi és jelenlegi intézetvezető professzorának, Dr. Székely György akadémikusnak és Dr. Antal Miklós egyetemi tanárnak a lehetőséget, hogy bekapcsolódhattam az intézet színvonalas kutatómunkájába. Köszönettel tartozom mindazoknak, akik szakmai irányításukkal vagy közvetlen segítségükkel hozzájárultak munkámhoz.

Köszönöm Dr. Antal Miklósnak, aki magas szintű tudásával és tanácsaival segítette munkámat. Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Birinyi András egyetemi docensnek, aki kutatásaimhoz kiváló szakmai útmutatást és segítséget nyújtott. Köszönet azoknak a jelenlegi és volt munkatársaimnak, akik az értekezésem alapjául szolgáló kutatómunkához szakértelmükkel és önzetlen segítségükkel hozzájárultak: Dr. Matesz Klára, Dr. Puskár Zita, Dr. Szűcs Péter, Dr. Veress Gábor, Dr. Vereb György, Dr. Viszokay Kornél, Dr. Kozák Norbert, Dr. Francis Odeh, Dr. Holló Krisztina, Eördögh Mária, Vargáné Marcsi, Laczkó Jenőné, Miklósné Durkó Ágnes, Nagy Ágnes Waschmanné Marcsi és Király Zoltán.

Köszönöm szüleimnek, hogy támogatták tanulmányaimat, valamint férjemnek és családom többi tagjának a bizalmat és türelmet.

11. FÜGGELÉK