

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

EMLŐS GERINCVELŐ MOTOROS NEURONHÁLÓZATAINAK MORFOLÓGIAI VIZSGÁLATA

Wéber Ildikó

Témavezető: Dr. Birinyi András



DEBRECENI EGYETEM
IDEGTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2012

EMLŐS GERINCVELŐ MOTOROS NEURONHÁLÓZATAINAK MORFOLÓGIAI VIZSGÁLATA

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében az Elméleti
orvostudományok tudományágban

Írta: Wéber Ildikó, okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Idegtudományi Doktori Iskolája
keretében

Témavezető: Dr. Birinyi András, Ph.D.

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csiba László, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Halasy Katalin, az MTA doktora
Prof. Dr. Mechler Ferenc, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: 2012. november 22. 10 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Fekete István, kandidátus
Prof. Dr. Kálmán Mihály, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csiba László, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Halasy Katalin, az MTA doktora
Prof. Dr. Mechler Ferenc, az MTA doktora
Prof. Dr. Fekete István, kandidátus
Prof. Dr. Kálmán Mihály, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: 2012. november 22. 11óra

1. BEVEZETÉS

A gerincvelői ritmusgeneráló hálózat

Régóta ismert, hogy a gerincvelő egy olyan, központi ritmusgenerátornak (CPG) nevezett neuronális hálózatot tartalmaz, amely a magasabb motoros központoktól és a perifériáról érkező szenzoros információk hiányában is képes a törzs- és végtagizmok térben és időben koordinált motoros működésének létrehozására és így az olyan ritmikus mozgások, mint az úszás, járás vagy vakaródzás létrehozására. A gerincvelői CPG hálózatot alkotó serkentő és gátló interneuronok a mozgás típusától függően a gerincvelői motoneuronok alternáló (járás), illetve szinkron (ugró mozgás) aktivitását hozzák létre.

Orsóhalban és *Xenopus* embrióban részletesen leírták az úszómozgásért felelős gerincvelői CPG struktúráját és működését. E két fajban a CPG sejtjei közül az úszás ritmusának generálásáért elsősorban olyan glutamáterg serkentő interneuronok felelősek, amelyek az ipsilaterális motoneuronokat aktiválják. A kétoldali törzsizmok alternáló aktivitását pedig kereszteződő axonnal rendelkező glicinerg commissuralis interneuronok (CIN) hozzák létre, melyek az ellenkező oldali motoneuronokat gátolják.

Az emlős CPG tanulmányozása a gerincvelői neuronok sokfélesége és a kapcsolatok gazdagsága miatt jóval nehezebb feladat. Emlősökben a hátsó láb ritmikus mozgatásáért felelős neuronhálózatok a lumbalis és a proximalis sacralis gerincvelői szegmentumokban találhatóak. 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. Izolált gerincvelőn végzett léziós vizsgálatok azt igazolták, hogy a gerincvelő ventromedialis harmada tartalmazza mindazon sejteket, melyek a koordinált ritmikus aktivitás létrehozásához szükségesek.

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 kontrakcióját kialakítani. A járómozgást létrehozó CPG-nak 3 alapvető feladatát különítik el:

- 1.) A ritmus létrehozását, amelyért a vizsgált úszó életmódot folytató fajokhoz hasonlóan emlősökben is serkentő tulajdonságú, glutamáterg, ipsilateralis axonnal rendelkező neuronok felelősek.
- 2.) Az azonos oldali flexor és extensor izmok működésének összehangolását, amelyben valószínűleg olyan ipsilateralis gátló interneuronok a meghatározóak, amelyek monoszinaptikusan kapcsolódnak a motoneuronokkal, azaz utolsó rendű premotor interneuronok.
- 3.) A bal és jobb oldali végtagok működésének összehangolását, amit döntően a commissuralis interneuronok biztosítanak.

Utolsó rendű premotor interneuronok

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 (**LOPI, last-order premotor interneuron**) nevezzük. 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 bemeneteket. Ebből adódóan meghatározó szerepük van a különböző helyekről származó információk integrálásában, valamint alapvető jelentőségűek a motoros működések elindításában és fenntartásában. Különböző fiziológiai és farmakológiai tulajdonságokkal rendelkező LOPI-okat írtak le, amelyek a korábban említett a CPG-n belül megtalálható három fő feladatkör mindegyikének

megvalósításában részt vesznek, és ezért a gerincvelői ritmusgeneráló motoros hálózat alapvető tagjainak tekinthetők.

Commissuralis interneuronok

Xenopus embrióban és orsóhalban úszás során a kétoldali törzsizmok alternáló aktivitását glicinerg commissuralis interneuronok (CIN) biztosítják. Az emlős gerincvelő ventromedialis szürkeállományának területén található commissuralis interneuronok az úszó gerincesekénél jóval heterogénebb sejtpopulációt képviselnek. Az axonok végződési mintázata alapján a sejttesttel azonos szegmentumba projiciáló intraszegmentális CIN-okat (sCIN) és távolabbi szegmentumokban végződő interszegmentális CIN-okat különböztetnek meg. Az összes CIN mintegy 10-15%-a intraszegmentális, jelentős részük olyan glutamáterg serkentő neuron, amely a motoneuronokkal ipsilateralisán elhelyezkedő interneuronokon keresztül gátolja a motoneuronok működését. A sCIN-ok egy másik csoportja az ellenoldali motoneuronokat monoszinaptikusan serkentő glutamáterg interneuron.

Az interszegmentális interneuronok mind axonprojekciójukat, mind a neurotranszmittereiket tekintve heterogén populációt alkotnak. Vannak csak felszálló (ascending- aCIN), csak leszálló (descending- dCIN) és elágazódó, fel- és lefelé egyaránt haladó (adCIN) axonnal rendelkező alcsoportok. Rágcsálókban a L2-es gerincvelői szegmentum ventralis szürkeállományában elhelyezkedő leszálló axonnal rendelkező CIN-ok többsége monoszinaptikus glutamáterg vagy glicinerg kapcsolatot létesít a contralateralis L4-es szegmentum motoneuronjaival. Ezen kívül poliszinaptikus gátló kapcsolatokat is leírtak, melyek GABAerg interneuronokon keresztül valósulnak meg. A dCIN-ok ezen kapcsolatai a gerincvelő L2-es és L4-es szegmentumaiban található flexor és extensor motoneuronok működésének koordinálásában alapvetőek. Így bár a dCIN-ok heterogén populációt alkotnak, a mozgás során azonban funkcionális egységként működnek.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Jelen munkánkkal az emlős motoros CPG működésének pontosabb leírásához szeretnénk 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.

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 bemenetet az utolsó rendű premotor interneuronok a perifériáról érkező primer afferensektől?

A CPG hálózat egy másik tagjával, a bal és jobb oldali végtagok alternáló mozgásának létrehozását biztosító **commissuralis interneuronokkal** kapcsolatban az alábbi kérdésekre kerestünk választ:

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

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. UTOLSÓ RENDŰ PREMOTOR INTERNEURONOK

Utolsó rendű premotor interneuronok jelölése újszülött patkány gerincvelőben

Újszülött (5-8napos) Wistar patkányokat mély altatásban decapitáltunk, a gyökereket megtartva eltávolítottuk a gerincvelőt, amit oxigenizált mesterséges agy-gerincvelői folyadékba (ACSF) helyeztünk. A L2-L4-es szegmentumok szintjében 10%-os biotinilált dextrán amint (BDA, MW:10 000, Molecular Probes) injektáltunk iontoforetikusan a lateralis motoros oszlopba. 4-8 óra múlva a gerincvelőt 2,5% glutáraldehidet, 0,5% paraformaldehidet és 0,2% pikrinsavat tartalmazó 0,1M-os foszfát puffer oldatban fixáltuk, majd a lumbalis gerincvelőből 60 μ m vastag metszeteket készítettünk vibrotommal. A BDA láthatóvá tételéhez a metszeteket avidin-biotin komplexet (ABC, 1:100, Vector Labs) tartalmazó oldatban inkubáltuk, majd nikkellel intenzifikált diamino-benzidin (DAB, SIGMA) reakciót végeztünk.

Utolsó rendű premotor interneuronok jelölése felnőtt patkány gerincvelőben

Wistar patkányokat (250-300g) nátrium-pentobarbitallal altattunk, majd a L3-5-ös szegmentumok magasságában laminectómiát végeztünk. A LOPI-ok jelölését az alábbi két protokoll szerint végeztük:

- 1.) Három állatban Neurobiotin (Vector Labs) 5%-os oldatát injektáltuk iontoforetikusan a lateralis motoros oszlopba. A Neurobiotin detektálásához a jelölt gerincvelőből készült metszeteket ABC oldatban inkubáltuk, majd barna színt adó, DAB kromogén reakciót végeztünk.
- 2.) Tizenegy állatban BDA 10%-os oldatát injektáltuk iontoforetikusan a lateralis motoros oszlopba. A jelölés láthatóvá tételéhez a metszeteket

ABC-t tartalmazó oldatban, majd sötétkéék színreakciót adó, nikkellel intenzifikált DAB oldatban inkubáltuk.

Primer afferensek jelölése felnőtt patkány gerincvelőben

A primer afferens terminálisok LOPI-okkal kialakított kapcsolatainak vizsgálataihoz az axonokat kétféle technikával jelöltük:

- 1.) A LOPI-ok Neurobiotinnal történő jelölése után az azonos oldali hátsó gyökeret átvágtuk és 10%-os tormaperoxidáz (HRP, Sigma) oldatba helyeztük. A HRP-vel jelölt axonok láthatóvá tételéhez a szabadon úszó metszeteket nikkellel intenzifikált DAB oldattal inkubáltuk.
- 2.) A LOPI-ok BDA-val való jelölése után Cholera toxin (CTb, List Biological) 1%-os oldatát injektáltuk nyomással átvágott nervus ischiadicus centrális csomkjába. A CTb kimutatása során primer antitestként nyúlban termeltetett anti-Ctb-t (1:10 000, List Biological), szekunder szérumként kecskében termeltetett biotinilált nyúl ellenes IgG-t (b-GAR, 1:200, Vector Labs) alkalmaztunk. Ezt követően ABC reakciót végeztünk, amit barna színt adó, DAB kromogén reakcióval tettünk láthatóvá.

3.2. COMMISSURALIS INTERNEURONOK

Commissuralis interneuronok és motoneuronok jelölése újszülött patkány gerincvelőben

Újszülött Wistar patkányokból ventralis laminektómia után a gyökereket megtartva eltávolítottuk a gerincvelőket, majd oxigenizált ACSF oldatot tartalmazó kamrába helyeztük azokat. A CIN-ok jelölésére a lumbalis gerincvelő L2-L4-es szegmentumai magasságában 10%-os BDA oldatot injektáltunk iontoforetikusan a szürkeállomány ventromedialis részébe. A motoneuronok jelöléséhez az injekcióval ellentétes oldali L2-5-ös ventralis gyökereket biocitin (Sigma) kristályokra fektettük. A gerincvelőt még 4-8 órán át a kamrában

tartottuk, majd 2,5% glutáraldehidet, 0,5% paraformaldehidet és 0,2% pikrinsavat vagy 4% paraformaldehidet tartalmazó oldatban fixáltuk. Fixálás után a lumbalis gerincvelőből 60 µm vastagságú metszeteket készítettünk. A CIN-ok BDA és a motoneuronok biocitin jelölésének láthatóvá tételéhez a metszeteket ABC oldatban inkubáltuk, majd nikkellel intenzifikált diamino-benzidin reakciót végeztünk.

A jelölt CIN-ok és motoneuronok közti kapcsolatok kimutatása

A BDA-val retrográd módon jelölt commissuralis interneuronok gerincvelőn belüli megoszlását mikroszkóphoz csatlakoztatott camera lucida segítségével rekonstruáltuk, majd Neurolucida programmal előállítottuk a gerincvelő és a benne pontszerűen ábrázolt sejtek térbeli eloszlását tartalmazó képet. A CIN-ok dendritfáit camera lucidával rekonstruáltuk. A CIN-ok és a motoneuronok közti kapcsolatok fénymikroszkópos azonosítása 100x-os olajimmerziós objektívvel történt Nikon Eclips 800 mikroszkóp alkalmazásával.

A kapcsolatok elektronmikroszkópos igazolásához a metszeteket 0,5%-os osmium-tetroxiddal kezeltük, majd alkoholban és propilén-oxidban történt dehidrációt követően Durcupan ACM (Fluka) műgyantába ágyaztuk. A termosztátban 56 °C-on polimerizálódott metszetekből a megfelelő részt kivágtuk és újraágyaztuk. Ultramikrotómmal ultravékony (60 nm) sorozat-metszeteket készítettünk, melyeket formvar hárttyával fedett nikkellel „slot” gridekre helyeztünk, majd uranil-acetáttal és ólom-citráttal kontrasztoltuk. Az elektronmikroszkópos vizsgálatok Jeol 1010 elektronmikroszkóppal történtek.

A jelölt CIN axon terminálisok transzmittereinek azonosítása

A CIN-ok neurotranszmittereit fluorescens festékekkel történő kettős és hármas jelölésekkel mutattuk ki. A BDA-val jelölt axon terminálisok serkentő karakterének vizsgálatára a metszeteket tengerimalacban termeltetett vezikuláris glutamát transzporterek (VGLUT1, VGLUT2; 1:5000, Chemicon) elleni

antitesteket tartalmazó 0,1 M-os PB oldatba helyeztük, szekunder szérumként pedig Alexa Fluor 546-tal konjugált kecskében termeltetett tengerimalac ellenes antitestet (GAG_P-Alexa 546, 1:1000, Molecular Probes) alkalmaztunk. A gátló CIN axon terminálisok azonosításához a metszeteket először 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 festékkel kapcsolt szekunder antitestekkel tettük láthatóvá: a GABA kimutatására a GAD65/67-hez Alexa Fluor 647-tel konjugált számban termeltetett nyúl ellenes antitestet (DAR-Alexa 647) kapcsoltunk, míg a terminálisok glicin tartalmát GLYT2-höz kapcsolódó Alexa Fluor 546-tal konjugált számban termeltetett birka ellenes antitesttel (DAS-Alexa 546, mindkettő 1:1000, Molecular Probes) mutattuk ki. Végül a metszeteket tárgylemezre helyeztük és Vectashielddel (Vector Labs) fedtük.

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 fluoreszcens 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 lehetségessé vált egy adott CIN terminális GABA és glicin tartalmának, illetve a két gátló transzmitter együttes előfordulásának vizsgálata is.

4. EREDMÉNYEK

4.1. UTOLSÓ RENDŰ PREMOTOR INTERNEURONOK ÉS PRIMER AFFERENSEKTŐL FOGADOTT KAPCSOLATAIK

Utolsó rendű premotor interneuronok újszülött patkány gerincvelőben

A L2-es és L4-es szegmentumok magasságában a lateralis motoros oszlopba adott BDA injekció után a jelölt sejtek többsége (83%) az injekcióval azonos oldalon helyezkedett el, de jelentős számban találtunk jelölt sejteket contralateralisan is (17%). Az ipsilateralis premotor interneuronok (LOPI) a gerincvelői szürkeállomány V-VIII-as lamináinak területén helyezkedtek el. A contralateralisan jelölt LOPCIN-ok többsége a VIII-as lamina területén koncentrált, de voltak sejtek a VII-es és a X-es laminák medialis részén is. 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.

Utolsó rendű premotor interneuronok felnőtt patkány gerincvelőben

Mind a Neurobiotin, mind a BDA L3-L5-ös szegmentumok szintjén adott injekciója nagyszámú LOPI-t jelölt, melyek többsége az injekcióval azonos oldalon helyezkedett el, s csak töredékük (2-6%) volt a contralateralis szürkeállományban. A gerincvelői sorozatmetszetek 3-dimenziós rekonstrukciója azt mutatta, hogy a jelölt sejtek a gerincvelő 3-4 szegmentum hosszúságú szakaszán találhatóak, legnagyobb denzitással az injekció helyén. A jelölt neuronok 20-50 μm átmérőjű szómáit az V-VII-es laminákban találtuk. A sejtestekből 2-5 dendritfa indult, amelyeket a szómától 300-400 μm távolságig tudtuk követni.

Primer afferensek LOPI-okkal kialakított kapcsolatai

A hátsó gyökér HRP töltése és a nervus ischiadicusba adott CTB injekció után nagyszámú primer afferens terminálist találtunk a jelölt utolsó rendű premotor interneuronokat tartalmazó V-VII-es laminák területén, ami lehetővé tette a jelölt terminálisok és a LOPI-ok sejttestei és dendritjei közti szoros appozíciók vizsgálatát. Vizsgálatainkban az összes jelölt interneuronnak csak töredéke (2,5%-9,2%) fogadott néhány kontaktust primer afferens terminálisoktól. A kontaktust fogadó LOPI-ok az injekciós helyek közelében (azaz az injekció során jelölődött motoneuronokhoz közel) az V-VI-os laminák mediolateralis és a VIII-as laminák dorsalis részén koncentráálódtak.

4.1. COMMISSURALIS INTERNEURONOK KAPCSOLATAI ÉS NEUROTRANSMITTEREI

Commissuralis interneuronok jelölése, morfológiája és eloszlása újszülött patkány gerincvelőben

A L4-es szegmentum magasságában a gerincvelői szürkeállomány ventromedialis területébe adott injekció kétféle módon is jelölhetett CIN-okat. Az injekció közelében található neuronok sejttestükön és dendritjeiken keresztül felvéve a jelölőanyagot az axonjukba transzportálták azt (ipsilateralis, **iCIN**). Ezen anterográd módon jelölődött CIN-ok axonjai a ventralis commissurában keresztezték a középvonalat és az ellenoldali szürkeállomány területén végződtek. A CIN-ok egy másik csoportjának axonjai (contralateralis, **cCIN**) az injekciós területben értek véget. Ezek a sejtek az axon terminálisaikon keresztül felvették, majd retrográd módon a szómába és a dendritekbe szállították a BDA-t.

Kísérleteinkben az injekció méretétől és pontos elhelyezkedésétől függően a jelölődött sejtek száma jelentősen eltért. A sejtek többsége az injekció szegmentumában helyezkedett el, de 1-2 szegmentummal rostralisabban és

caudalisabban is voltak jelölt neuronok. Figyelmünket elsősorban az injekcióval contralateralisan elhelyezkedő sejtekre fókuszáltuk. Ezek a neuronok axonjaikon keresztül retrográd módon megjelölt commissuralis interneuronok (cCIN) voltak, amelyek szómái a gerincvelő szürkeállományának ventromedialis területén (VII-es lamina medialis része, VIII-as és X-es laminák) koncentráálódtak.

Bár a CIN-ok morfológiája igen változatos, méretük, a sejttest alakja és a dendritarborizáció fő irányai alapján két fő csoportba soroltuk őket. Az egyik csoportba azok a neuronok kerültek, amelyek piramis alakú 10-20 μm átmérőjű szómáit a VII-es lamina medialis részében találtuk, a sejttestekből pedig a tér minden irányába eredtek dendritek. A nagyobb csoportot olyan poligonális szómával rendelkező sejtek alkották, melyek a szürkeállomány ventromedialis területének medialis részén helyezkedtek el közvetlenül a canalis centralis mellett.

Kapcsolat a gerincvelő két oldalán jelölődött commissuralis interneuronok között

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 sejten találtunk szinaptikus kapcsolatra utaló szoros összefekvéseket az anterográd módon jelölt iCIN-ok axon terminálisaival. A sejtek átlagosan két kapcsolatot fogadtak, amelyek kizárólag proximalis dendriteken fordultak elő.

Commissuralis interneuronok kapcsolatai motoneuronokkal

A ventromedialis injekciót követően az anterográd módon jelölt iCIN-ok axonjai a középvonalat keresztezve a contralateralis szürkeállomány ventromedialis területéig is eljutottak. Az axonok nagy részét a lateralis motoros oszlop területéig követni lehetett, ahol szoros appozíciókat alakítottak ki a biocitinnel jelölt motoneuronok sejttestén és dendritjein. Nagy nagyítású fénymikroszkópos vizsgálatokkal szoros összefekvéseket kerestünk a lumbalis gerincvelői motoneuronok szómái, dendritjei és az anterográd módon jelölődött CIN-ok axon terminálisai között. Alapos vizsgálattal 632 jelölt motoneuronból 291 esetben találtunk fénymikroszkóposan azonosítható szoros appozíciót. Az egyes motoneuronok 1-3 kontaktust fogadtak, melyek negyedét a szómákon, háromnegyedét proximalis dendriteken találtuk. A CIN-ok és motoneuronok közötti axoszomatikus és axodendritikus szinaptikus kapcsolatokat elektronmikroszkópos vizsgálatokkal is igazoltuk.

Commissuralis interneuronok neurotranszmitter tartalmának vizsgálata

A commissuralis interneuronok axon terminálisainak jelölésére BDA-t injektáltunk a gerincvelői szürkeállomány ventromedialis részébe. Az injekció oldalán elhelyezkedő iCIN-okból eredő axonköteg a középvonalat a ventralis commissurában keresztezve 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.

A vezikuláris glutamát transzporter fehérjék (VGLUT1,2) a glutamát szinaptikus vezikulákba történő szállítását végzik, így az ellenük termeltetett antitestek a glutamáterg axon terminálisok speciális markereinek tekinthetők. Ezért a serkentő tulajdonságú CIN-ok kimutatására VGLUT1 és VGLUT2 antitesteket használtunk. A BDA és VGLUT1,2 immunoreaktivitás kolokalizációját négy gerincvelőben vizsgáltuk. Az általunk vizsgált 590 BDA

jelölt CIN axon terminálisból 158 esetben tudtunk kimutatni VGLUT1,2 immunopozitivitást, azaz a BDA-jelölt CIN axon terminálisok közel negyede bizonyult serkentőnek.

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, így azok a CIN-ok, amelyek GABA-t használnak ingerületátvivő anyagként, GAD65 és GAD67 enzimek ellen termeltetett antitestekkel jelölhetőek. Öt állat ventralis szürkeállományában 1146 BDA-val jelölt CIN-t vizsgálva 350 reagált GAD65/67 antitesttel. Adataink alapján a teljes gerincvelői CIN populáció 14%-a, míg a gátló CIN terminálisok egynegyede használ kizárólag GABA-t gátló neurotranszmitterként.

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. 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.

Számos morfológiai és fiziológiai vizsgálat bizonyítja, hogy a GABA és a glicin ugyanazon axon terminálisban is jelen lehetnek a gerincvelői szinapszisokban. Ezért a két gátló neurotranszmitter kolokalizációját is tanulmányoztuk a gerincvelői CIN axon terminálisokban. 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.

Vizsgálataink alapján az újszülött patkányok commissuralis interneuronjai neurotranszmittereiket tekintve heterogén populációt képviselnek. 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. MEGBESZÉLÉS

5. 1. UTOLSÓ RENDŰ PREMOTOR INTERNEURONOK ÉS PRIMER AFFERENSEKTŐL FOGADOTT KAPCSOLATAIK

Utolsó rendű premotor interneuronok és primer afferensek jelölése felnőtt patkányban

A lateralis motoros oszlop területére adott BDA, illetve Neurobiotin iontoforetikus injekciója az utolsó rendű premotor interneuronok intenzív jelölődését eredményezte. A hátsó gyökéren alkalmazott HRP és a nervus ischiadicusba adott CTb injekció nagyszámú vastag mielinizált primer rostot jelölt, melyek az V-VII-es laminák területén végződtek. Mind a retrográd módon jelölt LOPI-ok mind az anterográd módon jelölt PA rostok rendkívül gazdag jelölődése egy olyan, számos sejtet és rostot tartalmazó mintát szolgáltatott számunkra, amiről úgy gondoljuk, hogy elégségesen nagy volt ahhoz, hogy eredményeink a teljes LOPI populációra vonatkoztatva reprezentatívak legyenek, ezzel lehetővé téve a LOPI-ok és primer afferensek közti szoros appozíciók első kvantitatív morfológiai leírását.

Primer afferensektől monoszinaptikus bemenetet fogadó LOPI-ok

Fiziológiai vizsgálatokban kimutatták, hogy I-es és II-es típusú izom afferensek és alacsony ingerküszöbű bőr afferensek egyaránt monoszinaptikus bemenetet szolgáltatnak a LOPI-ok számára. Ezen fiziológiai eredményeket megerősítve saját munkánkban morfológiai módszerekkel kimutattuk, hogy a PA terminálisok valóban létesítenek kontaktust LOPI-okkal, ugyanakkor eredményeink azt mutatják, hogy a LOPI-oknak csak kis százaléka (<10%) fogad néhány (1-5) monoszinaptikus bemenetet primer afferensektől. Ez a relatíve kisszámú input azonban mégis effektíven befolyásolhatja a LOPI-ok működését. Fiziológiai kísérletek alapján tudjuk, hogy az izom és bőr afferensek

stimulációja diszinaptikus EPSP-t és IPSP-t válthat ki a gerincvelői motoneuronokban. Mindez arra utal, hogy az általunk azonosított néhány kontaktus is képes lehet a LOPI-okban akciós potenciálokat kiváltani és ennek révén a szenzoros impulzusokat közvetlenül a motoneuronok felé továbbítani.

Jelen munka elsőként mutatja be a primer afferensektől monoszinaptikus bemenetet fogadó LOPI-ok lamináris és szegmentális eloszlását patkány lumbalis gerincvelőben. 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 helyezkednek el, ott, ahol a fiziológiai kísérletekben a motoneuronokkal monoszinaptikus kapcsolatban lévő, Ia és Ib bőr és ízületi afferensek által serkentett neuronokat azonosították.

5. 2. COMMISSURALIS INTERNEURONOK

Commissuralis interneuronok jelölése újszülött patkány gerincvelőben

A CIN-ok jelölésére BDA-t injektáltunk patkány lumbalis gerincvelők ventromedialis területébe. Az injekcióval azonos oldalon a CIN-ok (iCIN) sejttestükön és dendritjeiken keresztül felvették a jelölőanyagot, majd az axonjukba transzportálták azt. A jelölődött axonok a ventralis commissurában az ellenoldalra kereszteződve gazdagon elágazódtak a szürkeállomány területén. Emellett jelölődtek olyan CIN-ok is (cCIN), amelyeknek az injekció területén végződő axonja felvette a BDA-t, majd a sejttest és a dendritek irányába transzportálta azt. Ezeket a retrográd módon jelölődött sejttesteket az injekcióval ellentétes oldalon találtuk.

Utolsó rendű commissuralis interneuronok megoszlása és morfológiája

Felnőtt patkány gerincvelő laterális motoros oszlopába adott BDA injekció 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. Kísérleteinkben ezen korábbi megfigyelésekkel összhangban újszülött patkány gerincvelő L-2-es és L4-es szegmentumai magasságában a lateralis motoros oszlopba adott injekció után, az injekciótól contralateralisan elhelyezkedő 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 contralateralis motoneuronok szómáival és proximális dendritjeivel, azaz LOPCIN-oknak bizonyultak. A szinaptikus kapcsolatok meglétét elektronmikroszkópos szinten is igazoltuk.

Felnőtt patkány L1-2-es, valamint L3-4-es gerincvelői szegmentumai magasságában a lateralis motoros oszlopba adott BDA injekció után a jelölt LOPCIN-ok a kapcsolódó motoneuronoktól maximum 2 szegmentum távolságban voltak megtalálhatóak. Vizsgálataink alapján azonban úgy tűnik, hogy újszülött patkányban a LOPCIN-ok a motoneuronoktól jóval nagyobb rostrocaudalis távolságban is elhelyezkedhetnek, mivel a L2-es vagy a L4-es szegmentumok magasságában a lateralis motoros oszlopba adott injekció után a teljes lumbalis gerincvelő területén találtunk jelölt LOPCIN-okat, azaz a motoneuronoktól 3-4 szegmentumnyi távolságban is voltak jelölődött sejtek. Ezen 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.

Megfigyeltük, hogy habár a LOPCIN-ok a teljes lumbalis gerincvelő területén megtalálhatóak, eloszlásuk a gerincvelő rostrocaudalis tengelye mentén egyenetlen. Újszülött patkány L2-es és L4-es szegmentumai magasságában a

motoros oszlopba adott BDA injekció után nagyszámú jelölt LOPCIN-t találtunk a L1-4-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, míg a L5-6 szintjén csak kevés felszálló axonnal rendelkező LOPCIN van. Mindamellet, újszülött patkány L4-es szegmentumában a ventromedialis szürkeállományba adott BDA injekció után nem csak a L1-4-es szegmentumokban, hanem caudalisan az L5-6 ventromedialis szürkeállományában is jelentős mennyiségű jelölt CIN-t találtunk. Ebből arra következtethetünk, hogy a L5-6 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. Ugyanakkor újszülött patkányokban hasonló jelölési módszert alkalmazva a jelölt premotor interneuronok 18%-a volt LOPCIN. Ez a LOPCIN-ok számában megfigyelhető lényeges eltérés arra utalhat, hogy a motoneuronokkal monoszinaptikusan kapcsolódó CIN-ok szerveződésében jelentős posztnatális átszerveződés következhet be.

Kétoldali commissuralis interneuronok közti reciprok kapcsolatok

Orsóhalon és *Xenopus* embrión végzett számos fiziológiai kísérletben igazolták a kétoldali CIN-ok közötti reciprok gátló kapcsolatokat, amelyek a bal és jobb oldali törzsizmok alternált kontrakcióját szabályozzák, s így az úszómozgás létrehozásának kulcsfontosságú elemei.

Kísérleteinkben mi is 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. Azon megfigyelésünk pedig, hogy a commissuralis terminálisoktól kontaktus fogadó CIN-okat nem csak a jelölőanyag alkalmazásának szintjén, hanem az injekciótól rostralisán és caudalisan is találtunk, arra utal, hogy nem csak intra-, hanem interszegmentális CIN-CIN kapcsolatok is jelen vannak. Eredményeink azt sugallják, hogy ezek a reciprok interakciók igen gyakoriak lehetnek, mivel a vizsgált CIN-ok fele (49%) szoros appozíciót alakított ki ellenoldali CIN-ok axon terminálisaival.

A commissuralis interneuronok neurotranszmitterei

A CIN-ok által használt neurotranszmitterek meghatározására immuncitokémiai vizsgálatokat végeztünk, melyekben a transzmittert szintetizáló vagy transzportáló proteinek ellen termeltetett antitesteket használtunk. A BDA-val jelölt CIN-ok immunoreaktivitása azt mutatta, hogy a lumbalis gerincvelő ventromedialis szürkeállományának területén található CIN-ok serkentő és gátló neurotranszmittereket is használnak. Fontos hangsúlyozni azonban, hogy fiziológiai vizsgálatok nélkülözhetetlenek annak megállapítására, hogy a transzmitterhez kapcsolódó fehérjék jelenléte az axon terminálisokban együtt jár-e ezen aminosav neurotranszmitterek felszabadulásával.

Serkentő commissuralis interneuronok

Kísérleteink során kimutattuk, hogy 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. Elektrofiziológiai vizsgálatokban viszont az intraszegmentális és interszegmentális glutamáterg CIN-ok aránya is jóval nagyobbak bizonyult (70-77%). Ezen ellentmondás a fiziológiai mintavétel sajátosságaiból is adódhat, hiszen az a motoneuronokkal mono- vagy diszinaptikus kapcsolatban lévő CIN-okat vizsgálta, míg a morfológiai jelöléses vizsgálatok jóval szélesebb CIN populációról adnak képet.

Korábbi fiziológiai vizsgálatokban olyan kereszteződő glutamáterg CIN axonokat azonosítottak újszülött patkány gerincvelőben, amelyek contralateralis gátló premotor interneuronokon keresztül gátolták az ellenoldali motoneuronokat. Patkányban és macskában viszont az ellenoldali motoneuronokkal monoszínaptikusan kapcsolódó serkentő CIN-okat találtak. Ezen kísérletek alapján ma 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 a motoneuronok indirekt gátlását biztosítják, mely a kétoldali végtagok alternáló mozgásának létrehozásához járul hozzá. Úgy tűnik azonban, 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.

Gátló commissuralis interneuronok

Alacsonyabb rendű gerincesekben - orsóhalban és *Xenopus* embrióban - a középvonalat keresztező CIN-ok döntő többsége gátolja a contralateralis CPG neuronjait, ezáltal meghatározó szerepet játszanak az úszómozgás során

megfigyelt alternáló motoros mintázat létrehozásában. Farmakológiai és immunhisztokémiai vizsgálatokkal kimutatták, hogy a CIN-ok gátló hatásáért mindkét fajban glicinerg neurotranszmisszió felelős.

Újszülött patkány gerincvelőn végzett fiziológiai vizsgálatok azt mutatták, hogy a motoneuronokon megfigyelt ritmikus aktivitást létrehozó hálózatot főként glutamáterg serkentő neuronok alkotják, a gerincvelő két oldala közti aktivitás koordinálásáért pedig gátló CIN-ok 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, egér és macska gerincvelőben. Fiziológiai kísérletekből tudjuk, hogy az újszülött patkány gerincvelő L2-es szegmentumának glicinerg interszegmentális CIN-jai monoszínaptikusan gátolták a gerincvelő L4-es szegmentumának contralateralisan motoneuronjait. Macskában a L3-5-ös szegmentumok glicinerg CIN-jai gátolták a L7-es szegmentum contralateralis interneuronjait és motoneuronjait. Genetikai és fiziológiai vizsgálatok alapján egérben olyan felszálló axonnal rendelkező glicinerg CIN-okat azonosítottak, amelyek a contralateralis motoneuronok működését gátolták. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a keresztezett glicinerg transzmisszió meghatározó szereppel bír emlős gerincvelőben is.

Eredményeink alapján a gátló tulajdonságú CIN-ok közel fele (663-ból 350) mutatott GAD 65/67 immunoreaktivitást, ami a teljes CIN populáció 14%-át jelenti. Ugyanerre az eredményre jutottak újszülött egereken végzett vizsgálatokban is, ahol a vizsgált CIN-ok szintén 14%-a volt GABA-erg. Mindez arra utal, hogy rágcsálókban a glicin mellett a GABA is szerepet játszhat a bal-jobb oldali koordináció kialakításában.

Fiziológusok azt találták, hogy a GABA_A agonista muscimol és/vagy a GABA_B agonista baclofen alkalmazása a lumbalis gerincvelő motoros aktivitását lassítja, vagy akár teljesen meg is szünteti. Ugyanakkor a GABA_A antagonist bicucullin és a GABA_B antagonist phaclofen a gerincvelői motoros

aktivitás frekvenciáját és amplitúdóját is növeli. A GABA szerepe a gerincvelő két oldala közötti koordinációban vitatott. Fiziológiai kísérletekben a gerincvelő L2-es szintjén lokálisan alkalmazott bicucullin nem befolyásolta a bal-jobb oldali alternációt. Más vizsgálatokban viszont a GABA_A receptor antagonistá bicucullin vagy picrotoxin használatakor a gerincvelői motoneuronokon megfigyelt alternáló aktivitás helyett a kétoldali motoneuronok szinkron tüzelése volt megfigyelhető, ami arra utal, hogy a glicinen kívül GABA_A receptorok is szerepet játszhatnak a bal-jobb oldali aktivitás koordinálásában.

Jól ismert, hogy a két fő gátló aminosav transzmitter a GABA és a glicin az emlős gerincvelő terminálsaiban együttesen is megjelenhet. Patkány embrió és újszülött patkány 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 posztszinaptikus motoneuronokban. Saját adataink azt igazolták, hogy a gátló CIN terminálisok is használhatják mindkét aminosavat, mivel a vizsgált CIN terminálisok 17%-ában a glicin és a GABA együttes előfordulását találtuk újszülött patkányokban. A két gátló aminosav együttes jelenlétét egér lumbalis gerincvelői CIN-jaiban is igazolták, ahol az összes CIN mintegy 10%-a mindkét transzmittert tartalmazta. Ugyanakkor a glicin és GABA koexpressziójának relatíve alacsony volta azt sugallja, hogy a gátló transzmittereket használó CIN útvonalak jelentős része egymástól függetlenül működik. Azt feltételezik, hogy az intrasegmentálisan projiciáló commissuralis interneuronok többsége glicinerg, míg a két gátló neurotranszmitter együttes előfordulása az intersegmentális CIN-ok esetében jelentős. Glicinerg és GABA-erg szinapszisok szelektív 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.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A doktori értekezésben a gerincvelői ritmusgenerátor hálózat (CPG) két tagját, a motoneuronokkal monoszintaptikusan 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 laterális motoros oszlop területébe 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. 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 laterális motoros oszlop motoneuronjainak közel fele szinapszisokat fogad commissuralis interneuronoktól. Az axoszomatikus és axodendritikus kapcsolatokat elektronmikroszkópos szinten is igazoltuk. Elsőként sikerült kimutatnunk CIN-CIN közti reciprok kapcsolatok meglétét emlős gerincvelőben. Immunhisztokémiai módszerek alkalmazásával kimutattuk, hogy a CIN-ok valamivel több, mint negyede VGLUT 1,2 immunoreaktív, azaz glutamáterg serkentő neuron, míg közel 60%-uk gátló neurotranszmittert használ. A gátló terminálisok háromnegyede glicinergnek, közel felük GAD 65/67 immunopozitívnak bizonyult, míg a jelölt terminálisok 29%-a mindkét gátló transzmittert tartalmazta. Eredményeink azt mutatják, hogy az újszülött patkány gerincvelő CIN-jai, serkentő glutamáterg, valamint gátló GABAerg és glicinerg sejteket egyaránt tartalmazó heterogén csoportot alkotnak.

7. 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. Viszokay, **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. Viszokay, **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.