

# **Perinatális kezelések hatása újszülött patkányok korai idegrendszeri fejlődésére**

**PhD. értekezés**

**Dr. Kiss Péter**  
PTE ÁOK Anatómiai Intézet

**Doktori Iskola vezetője: Dr. Lénárd László**  
egyetemi tanár

**Programvezető: Dr. Csernus Valér**  
egyetemi tanár

**Témavezető: Dr. Reglódi Dóra**  
egyetemi docens

**2008**

## **Tartalomjegyzék:**

<b>Bevezetés.....</b>	<b>3</b>
<b>Anyagok és módszerek.....</b>	<b>10</b>
<b>Eredmények.....</b>	<b>26</b>
<b>Megbeszélés.....</b>	<b>63</b>
<b>Összefoglalás.....</b>	<b>81</b>
<b>Irodalom.....</b>	<b>82</b>
<b>Saját közlemények listája. ....</b>	<b>102</b>
<b>Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>108</b>

# 1. Bevezetés

A perinatális időszak alapvető fontosságú az idegrendszer fejlődésében. Az ebben az időszakban bekövetkező károsító hatások súlyos következményekkel járhatnak, melyek a felnőtt élet minőségét is befolyásolhatják. A hypoxiás/ischaemiás és különféle toxikus léziók hosszú távú hatásai számos vonatkozásban jól ismertek (Berger és Garnier, 1999). A különböző perinatális károsodásokat követően a rehabilitáció legfontosabb feladata a fejlődést minél előbb a normális szintre hozni (Beaulieu, 2002). Az idegrendszer -főleg gyermekkorban- nagyfokú plaszticitással és regenerációs képességgel bír, amely tulajdonságok lehetővé teszik a károsodások következményeinek kivédését. Igen fontos azonban mindazon környezeti faktorok vizsgálata is, melyek ezt az át- és újjáépítési folyamatot befolyásolhatják. Azonban a korai, közvetlenül a posztnatális időszakot érintő változásokról keveset tudunk annak ellenére, hogy az irodalomban már felhívták a figyelmet a korai elváltozások prognosztikai jelentőségére, még állatkísérletes modellekben is (Ten et al., 2003).

Patkányokban a születés utáni első két hét egy kritikus fejlődési periódusa az idegrendszernek, mely embernél az utolsó intrauterin hónapok történéseinek felel meg. Az újszülött patkány az emberhez képest sokkal fejletlenebb, szeme és külső hallójárata zárva van. Ezek kinyitása a metszőfog áttörés napjával együtt meghatározott időpontban történik. A normál fejlődés során a patkányok motoros képességei folyamatosan javulnak. A különböző poszturális és komplex lokomotoros reflexek fokozatosan jelennek meg, végül a harmadik posztnatális hét végére érik el a felnőttkorra jellemző fejlettségi szintet. A normális fejlődési mintázat szerint a mellső végtag mindig megelőzi fejlettségben a hátsót, és a reflexteljesítmények javulása is meghatározott mintázatot követ (Altman és Sudarshan, 1975; Donatelle, 1977; Markus és Petit, 1987). Ugyanakkor a bonyolultabb motoros koordináció fejlődése néhány héttel tovább tart az elemi reflexekénél. Az összetettebb motoros képességekkel párhuzamosan fejlődő újdonságkereső, ún. novelty-seeking magatartás vizsgálata önmagában is különösen érzékeny a pszichomotoros stimulánsok hatásának mérésére (Kabbaj et al., 2000;

Stansfield et al., 2004; Zheng et al., 2004). A legérzékenyebb életkor ennek vizsgálatára a korai adolescens periódus (Stansfield et al., 2004). Ebben az életkorban, három-négy hetesen mutatja a patkány a legélénkebb aktivitást, majd az idő előrehaladtával enyhén visszaesik és beáll a felnőttkorra jellemző szintre.

### **Jelen PhD dolgozat alapjául szolgáló kísérleteinkben újszülött patkányokat különböző kezeléseknél vetettük alá.**

Négy különböző kezelési módszert alkalmaztunk kísérleteink során.

Ezek közül kettő kezelés célja az volt, hogy a különböző károsító tényezőkkel, a nátrium-glutamáttal kiváltott toxikus és hypoxiás/ischaemiás idegrendszeri károsodást modellezzük patkányon, és kidolgozzunk egy általánosan alkalmazható tesztrendszert a korai elváltozások kimutatására.

Ezenkívül a plaszticitást nagymértékben elősegítő ingergazdag környezet hatásait is megvizsgáltuk az idegrendszeri fejlődésére és károsító ágensek hatásainak kivédésére.

Negyedik modellként a neurotrófikus faktorok családjába tartozó hypophysis adenilát cikláz aktiváló polypeptid (PACAP) általános fejlődési és esetleges neuroprotektív hatásait vizsgáltuk.

Az újszülött patkányok neuronális fejlődését elsősorban funkcionális tesztekkel vizsgáltuk az állatok fizikális paramétereinek és neurológiai reflexeinek mérésével. A motoros koordináció fejlődését is vizsgáltuk különféle tesztekkel, valamint az un. open-field magatartást és az explorációs, újdonságkereső magatartást is megfigyeltük az egyes kezeléseket követően.

#### **1.1. A nátrium glutamát (monosodium-glutamate, MSG)**

Számos neurotoxinról ismert, hogy károsodást idéz elő újszülött patkányokban a neuronális fejlődésben és a motoros, valamint kognitív funkciókban (Archer et al., 2002, 2003; Beninger et al., 2002; Harry, 1998; Kostrzewa et al., 2003; Palomo et al., 2003; Reddy et al., 2002). A glutamát a leggyakoribb excitátoros neurotranszmitter az agyban,

de ugyanakkor excitotoxin is (Segura-Aguilar és Kostrzewa, 2004), mivel a nagyobb mennyiségben felszabaduló glutamát az NMDA receptorokon keresztül neuronpusztulást vált ki különböző kórfolyamatokban. A nátrium-glutamát élelmiszer adalékanyag, ízfokozóként széles körben alkalmazott szer az élelmiszeriparban. Felnőttben csak minimális hatása van (pl. az ún. „kínai étterem szindróma”: az étkezés közben vagy röviddel utána jelentkező hányinger, hideg veríték, szédülés, ájulás, forróságérzet az arcon, nyakon, vállakon és végig a gerincen, fejfájás, szívdobogásérzet). Mivel érett vér- vagy gáton nem jut át jelentős mennyiségben, így maradandó idegrendszeri károsodást jelenlegi ismereteink szerint nem okoz. Ugyanakkor az újszülött rágcsálóknak adott nagy dózisu subcutan glutamát kezelés súlyos elváltozásokat okoz: neuronpusztulást a nucleus arcuatusban, a retina belső rétegeiben és számos egyéb agyterületen (Arees és Mayer, 1970; Beas-Zarate et al., 2002; Chaparro-Huerta et al., 2002; Gonzalez-Burgos et al., 2001; Heiman és Ben-Jonathan, 1983; Ishikawa et al., 1997; Kubo et al., 1993; Olney, 1969; Pesini et al., 2004; Stricker-Krongrad és Beck, 2004; van Rijn et al., 1986). A retinális károsodást és ennek kivédési lehetőségeit munkacsoportunk is vizsgálta (Atlasz et al., 2008; Babai et al., 2005, 2006, Tamás et al., 2004). Ezenkívül endokrinológiai, neurokémiai és cirkadián változások is kimutathatóak (Dawson és Lorden, 1981; Kim et al., 2005; Lengvári, 1977; Mistlberger és Antle, 1999; Miyabo et al., 1985; Schoelch et al., 2002; Urena-Guerrero et al., 2003). A glutamát neurotoxicitása a motoros, szenzoros és tanulási képességek váltazásaiban is megnyilvánul (Dubovicky et al., 1997; Fisher et al., 1991; Iwata et al., 1979; Saari et al., 1990). Irodalmi adatok vannak arra, hogy a glutamát-kezelt patkányok farokrángási reflexideje megnyúlik és mancsuk markolásának ereje is csökken (Fisher et al., 1991; Iwata et al., 1979; Squibb et al., 1981), azonban ezeken kívül kevés adat van a neurológiai reflexteljesítmény és motoros koordináció vonatkozásában. A lokomotoros aktivitásról szóló adatok ugyanakkor nem egyöntetűek: különböző szerzők mind hyper-, mind pedig hypoaktivitást leírtak (Araujo és Mayer, 1973; Katz, 1983; Klingberg et al., 1987; Saari et al., 1990; Dubovicky et al., 1997; Pizzi és Barnhart, 1976; Poon és Cameron, 1978; Iwata et al., 1979; Seress, 1982; Hlinak et al., 2005), míg mások nem találtak eltérést ebben a vonatkozásban (Klingberg et al., 1987; Ishikawa et al., 1997; Ali et al., 2000; Sanchis-Segura és Aragon, 2002). Glutamát

kezelés hatásáról patkányok novelty-seeking magatartására, ennek a magatartásformának a ismert fontossága ellenére is csak kevés adat van, ezért választottuk kísérleteinkhez.

## **1.2. Hypoxiás/ischaemiás lézió**

A hypoxiás/ischemiás agykárosodás a fejlett modern szülészeti és csecsemőellátási lehetőségek ellenére is egy komoly probléma, mind érett, mind pedig éretlen újszülöttekben, koraszülöttekben, mivel súlyos maradandó sérüléseket okozhat. Ezért is fontos egy olyan kísérletes állatmodell, melyben tanulmányozható a károsodás pathomechanizmusa (Andine et al., 1990). A leggyakrabban alkalmazott ilyen modell az egyoldali arteria carotis communis lekötéssel létrehozott ischemiás, majd ezt követő hypoxiás expozíció. Kevés az adat arra vonatkozóan, hogy az általunk használt tesztekben milyen teljesítményt nyújtanak a hypoxiás/ischaemiás lézió átesett állatok, pedig a neurológiai reflexek és a motoros koordináció fejlődésének vizsgálata jól tükrözik a posztnatális neuronális fejlődést (Altman et al., 1975; Donatelle, 1977; Fox, 1965; Hill et al., 1991; Smart et al., 1971). Korábbi kísérletekben kimutatták, hogy néhány neurológiai reflex, pl. a felegyenedési reflex és a geotaxis hogyan változik rövid távon egy hypoxiás léziót követően, valamint milyen korrelációban vannak ezek a korai eltérések a hosszú távú funkcionális deficitekkel, melyeket water-maze teszttel vizsgáltak egérben (Ten et al. 2003). A szerzők felhívják a figyelmet a korai elváltozások prediktív értékére, és azok meghatározásának fontosságára.

Ezekon az adatokon alapulva második lézió típusnak a fentebb említett hypoxiás modellt alkalmaztuk. Ezenkívül célunk volt még az általunk alkalmazott motoros koordinációs, és open-field magatartást vizsgáló tesztek elvégzését, ezekről ugyanis ellentmondásos adatok állnak csak rendelkezésre az irodalomban.

## **1.3. A hypophysis adenilát cikláz aktiváló polypeptid (PACAP)**

A PACAP-ot 1989-ben izolálták birka hypothalamusból, mint a vasoaktív intestinalis polypeptid (VIP)/secretin/glucagon peptidcsalád új tagját, mely 67%-os szerkezeti hasonlóságot mutat a VIP-el (Arimura, 1998; Sherwood et al., 2000; Vaudry et al., 2000).

Ismert 38 illetve 27 aminosav hosszúságú formája, melyek közül a PACAP38 dominál az emlős szövetekben (Arimura, 1998). Felfedezése óta számos hatását írták le, többek között részt vesz központi és perifériás idegrendszeri reguláló folyamatokban, valamint ismertté váltak sokrétű szisztémás hatásai, például a cardiovascularis rendszerben, a légző apparátusban, az emésztő- és kiválasztószervrendszerben (Arimura, 1998; Sherwood et al., 2000).

Felfedezését követően kiderült, hogy a PACAP neurotrófikus és neuroprotektív hatásokkal rendelkezik (Vaudry et al., 2000; Somogyvári-Vigh és Reglődi, 2004). *In vitro* stimulálja a neuronok növekedését és túlélését, gátolja az apoptózist, és védi a neuronokat változatos sejtkárosító ágensekkel szemben (Arimura, 1998; Vaudry et al., 2000). *In vivo*, neuroprotektív hatással rendelkezik globális és fokális cerebrális ischaemiában (Reglődi et al., 2000; Uchida et al., 1996). Kétféle receptortípusa ismert: a PAC1, mely szelektíven köt PACAP-ot, és VPAC1 és 2 receptorok, melyek egyforma affinitással kötik a VIP-et és a PACAP-ot (Arimura, 1998).

Korábbi eredmények bizonyítják a PACAP fontosságát az idegrendszer normális fejlődésében is. PACAP mRNS mutatható ki a fejlődő patkányagy különböző struktúráiban (Skoglosa et al., 1999), illetve a PACAP és a receptorának génje nagy mennyiségben expresszálódik egér velőcsőben a fejlődés korai stádiumaiban (Waschek et al., 1998). Feltételezések szerint a peptid a sejtproliferációt és a génexpressziót szabályozza a velőcső fejlődése során (Waschek et al., 1998). Számos egyéb kutatás bizonyítja a PACAP részvételét a mitózis, a differenciálódás és az apoptózis regulációjában a neurogenesis során (Campard et al., 1997; Lu és DiCicco-Bloom, 1997; Nicot és DiCicco-Bloom, 2001; Przywara et al., 1998; Tabuchi et al., 2001; Vaudry et al., 2000).

Újszülött patkányok PACAP kezelésének hatásáról csupán néhány adat áll rendelkezésre. A PACAP lokális alkalmazása megnöveli a kisagykéreg tömegét és serkenti a neuronok migrációját 8 napos patkányokban (Vaudry et al., 1999). A VIP, ami a PACAP legközelebbi homológja, úgyszintén bizonyítottan részt vesz a neuronális fejlődésben. A VIP neuroprotektív hatású a fejlődő agyban, míg VIP antagonistá kezeléssel súlyos microcephaliát, és a neuronális fejlődés visszamaradását okozza (Gressens et al., 1994; Gressens et al., 1999; Hill et al. 1991).

Mindezen irodalmi és saját korábbi kísérletes adatainkon alapulva vizsgáltuk a PACAP kezelés hatásait újszülött patkányok neuronális fejlődésére önmagában alkalmazva, majd ezt követően vizsgáltuk neuroprotektív hatását a toxikus léziós modellben.

#### **1.4. Ingergazdag környezet**

Hebb (1949) azon véletlen felfedezése, hogy a háziállatként otthonában felnevelkedett patkányok jobb teljesítményt nyújtanak egyes problémamegoldó tesztekben, mint a laborban nevelkedettek, rávilágított a környezeti hatások szerepének fontosságára az idegrendszer fejlődésében. A szabványos ketrecmérethez képest nagyobb életteret biztosítva változatos és folyamatos új ingerekkel láthatjuk el az állatokat, így lehetőséget kapnak több szociális interakcióra, illetve a környezetükbe helyezett tárgyakkal való játékokra. Ez az ingergazdagság a pozitív környezeti hatásokat erősíti, így segíti a fejlődést. Az ingergazdag környezet számos neurokémiai és morfológiai változást idéz elő az agyban, mint például a cortex vastagsága nő, növekszik a dendrittüskék denzitása a neuronokon, egyes neurotrófikus faktorok és receptoraik expressziója fokozódik és serkenti a neurogenézist számos agyterületen még idős állatokban is (Franklin et al., 2006; Pham et al., 1999; Schneider et al., 2006; Segovia et al., 2006). Ezenkívül tanulási tesztekben, a szociális viselkedésben és az explorációs magatartásban javul az állatok teljesítménye, valamint félelemérzetük is csökken (Fernandez-Teruel et al., 1997; Schneider et al., 2006; van der Harst et al., 2003). Mindezen pozitív hatásai által az ingergazdag környezet képes csökkenteni különböző toxikus (ólom, nátrium-glutamát és valproát indukálta), ischaemiás és traumás károsodások negatív hatásait (Fischer és Peduzzi, 2007; Held et al., 1985; Iuvone et al., 1996; Saari et al., 2001; Schneider et al., 2001; Schneider et al., 2006).

Ugyanakkor ezen kísérleteket elsősorban felnőtt patkányokkal végezték, és nem áll rendelkezésünkre irodalmi adat arról, hogy hogyan befolyásolja az ingergazdag környezet a korai funkcionális idegrendszeri fejlődést. Annak a vizsgálata is nagyon fontos, hogy a perinatális károsodásokat modellező állatkísérletekben milyen rövid vagy hosszú távú hatásai vannak az ingergazdag környezetnek, hiszen ennek fontossága már a klinikai gyakorlatban is bizonyított. A gyermeki idegrendszer nagyfokú plaszticitásának



köszönhetően rendelkezik azzal a potenciállal, hogy reorganizáció révén helyreállítsa agyi funkcióit sérülés után. Azonban a környezeti hatások teszik lehetővé ennek a potenciálnak a kihasználását (Beaulieu, 2002). Mindezen adatok ismeretén alapulva vettük kísérleteinket az ingergazdag környezet hatásának vizsgálatával bővítettük normál, és nátrium-glutamát kezelt patkányok fejlődésére.

## **1.5. Célkitűzések**

1. Újszülött patkányok idegi fejlődésének vizsgálata egy standardizált neurológiai tesztrendszer segítségével:

- toxikus (nátrium-glutamát által kiváltott) idegi léziót és
- hypoxiás/ischaemiás léziót elszenvedett,
- neurotrófikus faktorra (PACAP-al) kezelt és
- ingergazdag környezetben nevelt állatok esetén.

2. Annak vizsgálata, hogy a toxikus lézió káros következményeit képes-e csökkenteni a PACAP kezelés vagy az ingergazdag környezet.

## **2. Anyagok és módszerek**

### **2.1. Kísérleti állatok**

Teljes Wistar patkány almokat (egyedszám  $12\pm 1$ ) használtunk születésüktől fogva hat hetes korig. Az almokat úgy állítottuk össze, hogy az egy időpontban született patkányokat összegyűjtöttük, összekevertük és egyenlő számban szétosztottuk az anyák között, hogy a genetikai hatásokat minimalizáljuk. A nemi izoláció hatásának kiküszöbölésére, és mivel irodalmi adatok alapján nincs különbség a korai életperiódusban a hím és nőstény egyedek fejlődése között, a teljes almok adatait értékeltük (Fernandez et al. 2000, Le Roy et al., 1999). Ugyanakkor minden egyed nemét feljegyeztük, és külön vizsgáltuk eredményeiket esetlegesen kimutatható nemi különbségeket keresve.

Az egyes állatok random módon kerültek kiválasztásra, az összes alom tartalmazott kontroll és kezelt állatokat is a különböző kezelések alkalmával, és az egyes csoportokat a saját kontrolljaikhoz hasonlítottunk a statisztikai elemzés során.

Az állatok elhelyezése, gondozása és felhasználása ellenőrzött protokollok szerint az intézeti ajánlások figyelembevételével történt (No: BA02/2000-31/2001, Pécsi Tudományegyetem). 12 órás sötét-világos ciklusban, élelem és víz folyamatos biztosítása mellett tartottuk az egyedeket. Az anyától való elválasztás 4 hetes korban történt.

### **2.2. Kezelések**

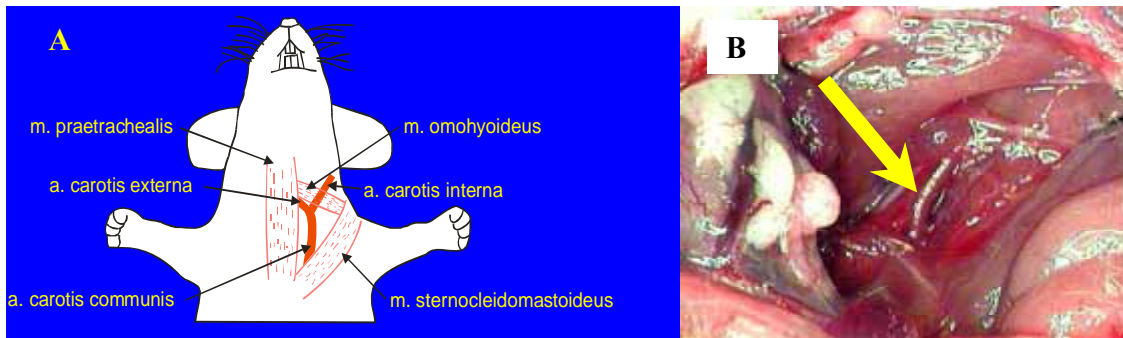
#### 2.2.1. Nátrium-glutamát kezelés

Több kezelési protokollt kipróbáltunk, magas és alacsony dózist, háromszori és ötszöri kezelésben egyaránt. A nátrium-glutamátot subcutan injekciós formában adtuk  $100\ \mu\text{l}$  fiziológiai sóoldatban oldva az 1, 3, 5, 7, 9. illetve 1, 5, 9. posztnatális napokon. Irodalmi

leírásoknak és saját korábbi megfigyeléseinknek (Babai et al., 2005, 2006; Dunn és Webster, 1985; Kiss et al., 2005, 2006; Klingberg et al., 1987; Kubo et al., 1993) megfelelően választottuk az alkalmazott dózisokat: a magas dózis 4 mg/testtömeg gramm, az alacsonyabb 2 mg/testtömeg gramm volt. A kontroll állatok ugyanezek a napokon fizioiógias sóoldatot kaptak.

### 2.2.2. Hypoxiás/ischaemiás lézió

Ehhez a kísérlethez nem újszülött, hanem 7 napos állatokat használtunk. Halothan anaesthesia mellett, operációs mikroszkóp alatt egy középvonali nyaki bemetszésen át felkerestük a bal oldali a. carotis communist és a nervus vagustól való óvatos szétválasztást követően permanensen lekötöttük (1. ábra).



1. ábra: A műtéti terület vázlatos képe (A), és egy a lekötést megelőző állapotot bemutató intraoperatív kép (B), a nyíl az a. carotis communis sinistrát mutatja.

Az állatok testhőmérsékletét a beavatkozás során folyamatosan 37 °C-on tartottuk. A műtét után (mely hozzávetőlegesen 5 percet vett igénybe), az állatokat egy légmentesen záró kamrába helyeztük, melybe 8% oxigént és 92% nitrogént tartalmazó gázkeveréket vezettünk be. Az állatokat 2 óra hosszat tartottuk ebben a hypoxiás kamrában. A sham-operált kontroll egyedeknél a nyaki bemetszést követően felkerestük az a. carotis communist, de nem kötöttük le. A hypoxiás kamra helyett pedig a műtét után normál légköri levegőn (azaz 21% oxigénben) töltötték 2 órát. Ezt követően visszahelyeztük az állatokat az anyjuk mellé.

### 2.2.3. PACAP

A PACAP kezelt patkányok subcutan injekció formájában 100 µl fiziológias sóoldatban oldott 1µg PACAP 38, vagy 10 µg PACAP antagonistá PACAP 6-38 kezelést kaptak a születés napjától kezdve két héten keresztül mindennap. A kontroll állatok csak fiziológias sóoldatot kaptak. Az injekciót az állatok hátának bőre alá adtuk, az itt található még újszülött állaton is jelentős mennyiségű subcutan szövetbe. A kezelés során alkalmazott dózist irodalmi adatok alapján választottuk (Telegdy et al., 2000; Vaudry et al., 1999).

### 2.2.4. Ingergazdag környezet

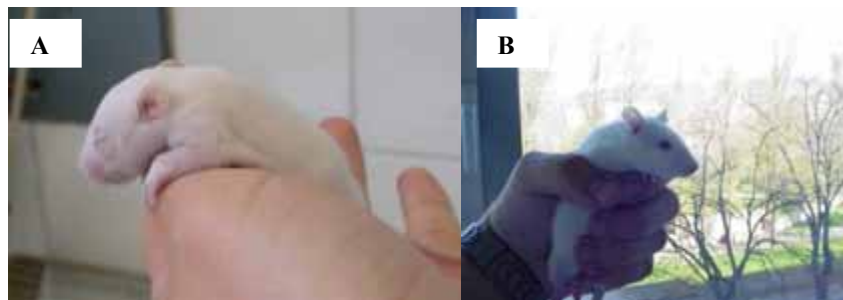
Kétféle elrendezést alkalmaztunk ezen kísérleteink során. Az állatok első csoportját a hagyományos ketrecekben tartottuk, melynek alapterülete 43x30 cm, magassága 20 cm. Ezen tartási körülmény szolgált az “ingerszegény” környezetnek (2.A ábra). Az állatok második csoportját egy nagyobb alapterületű és magasabb ketrecben tartottuk születésük után (88x50cm alapterület és 44 cm magasság) (2.B ábra) ez volt az ingergazdag környezetben tartott állatcsoport. A nagy ketrecbe a megnövelt lélettéren kívül különféle formájú, színű és anyagú játékokat helyeztünk, majd azok felét naponta cserélve biztosítottunk számukra változatos környezetet, az ingergazdagságot tovább növelve (2.C ábra).



2. ábra: A: hagyományos ketrec, B: nagy ketrec játékok nélkül, C: ingergazdag nagyketrec.

### 2.3. A neurológiai jelek és reflexek vizsgálata

A neurológiai fejlődést naponta 12 és 15 óra közötti időpontban vizsgáltuk, a kezelési periódusban a napi kezeléseket megelőzően. Figyelemmel követtünk egyes fizikális jellemzőket is, feljegyeztük a szemnyitás, a metszőfogkinövés és a fül kiegyenesedésének napját (3. ábra) (Smart és Dobbing, 1971a,b).



3. Ábra: A: 8 napos, B: három hetes, érett paraméterekkel rendelkező kispatkány.

Az állatok súlyát is mértük minden nap. A neurológiai jeleket és reflexeket munkacsoportunk által irodalmi adatok alapján összeállított tesztrendszer segítségével vizsgáltuk (Altman és Sudarshan, 1975; Bures et al., 1983; Dam et al., 2000; Hill et al., 1991; Smart és Dobbing, 1971).

#### 2.3.1. Felegyenesedési (righting) reflexek

- (a) A patkányokat a hátukra fordítottuk, és tizedmásodperc pontossággal regisztráltuk, hogy mennyi idő múlva fordult meg az állat mind a négy mancsát a talajra helyezve.
- (b) 50 centiméter magasból fejjel lefelé egy szivacsra ejtve az állatokat, a négy végtagjukra érkezésük első napját jegyeztük fel.

#### 2.3.2. Negatív geotaxis

Az állatokat egy 45°-ban megdöntött, 30 cm magas rácsra helyeztük fejjel lefelé úgy, hogy az állat hátsó végtagja a rács közepén volt (4.A ábra). Feljegyeztük azt a napot,

amikor a patkány megfordult, és felmászott a rács tetejére, azaz amikor mindkét mellső mancsával elérte annak legfelső fokát (4.B és 4.C ábra). Abban az esetben, ha az állat nem teljesítette a feladatot 30 másodpercen belül, a teszt eredményét negatívnak vettük. A pozitív teszt megjelenésének napjától mértük a teljesítés idejét tizedmásodperc pontossággal.



4. ábra: A negatív geotaxis vizsgálata: az állatot egy 45°-ban megdőntött rács közepére helyeztük fejjel lefelé (A), majd vizsgáltuk, hogy az állat mikor fordul meg és mászik fel a rácson (B). A teszt pozitívnak tekinthető akkor, ha az állat mindkét mellső végtagjával eléri a rács legfelső fokát (C).

### 2.3.3. Keresztezett extenzor reflex

Fájdalomingerrel alkalmazva a bal hátsó végtagon (csipeszcsípés), vizsgáltuk az állat reakcióját. Azt a napot jegyeztük fel, amikor látszólag eltűnt a keresztezett extenzor reflex, vagyis az ellenkező oldali végtag extenziója elmaradt (5. ábra). Az állat ilyenkor egy, az egyszerű reflextevékenységnél bonyolultabb, összetettebb mechanizmusú elhárító magatartással válaszolt az inzultusra.



5. ábra: A keresztezett extenzor reflex vizsgálatát a hátsó végtagon alkalmazott fájdalomingerrel vizsgáltuk.

#### 2.3.4. Fülrángás reflex

Vattapálcával óvatosan megérintettük a fül szélét, és az erre bekövetkező fülrándítás megjelenésének napját regisztráltuk.

#### 2.3.5. Szemhéjreflex

Vattapálcával óvatosan megérintettük a szemrést (illetve a szemnyitás napja előtt annak leendő helyét, a szemhéjak találkozását), és a válaszként bekövetkező izomkontrakció megjelenésének napját regisztráltuk.

#### 2.3.6. Végtag kontakt ráhelyezési (placing) reflex

A mellső és hátsó mancs dorzális felszínét a vizsgálóasztal széléhez érintettük, és feljegyeztük azt a napot amikor az állat először felemelte az adott végtagot és ráhelyezte az asztalra.

#### 2.3.7. Taktilis fogóreflex (grasping)

Egy vékony rúddal érintettük a patkány mellső és hátsó végtagjának ventrális felszínét, és regisztráltuk az első napot, amikor erre az érintésre a rúd megragadásával válaszolt (6. ábra).



6. ábra: A fogóreflex vizsgálata: az állat mellső végtagjának ventrális felszínét egy rúddal megérintve az állat a rúd ráfogásával válaszol (A). Ugyanezt a reflexet vizsgáltuk a hátsó végtaggal is (B).

#### 2.3.8. Elmozdulási reflex

Egy 13 centiméter átmérőjű fehér papírkorong közepére helyeztük az állatokat. A jel megjelenésének napjától kezdve tizedmásodperc pontossággal mértük azt az időt, ami alatt az állat mindkét mellső mancsa elhagyta a korong területét. Abban az esetben, ha az állat 30 másodpercen belül nem jött le a korongról, a tesztet negatívnak értékeltük.

#### 2.3.9. Akusztikus megrettenési reflex

Regisztráltuk az első napot, amikor az állat egy hirtelen hangingerre (taps) összerezett.

### **2.4. Motoros koordináció vizsgálata**

Az állatokat 2-5 hetes kor között teszteltük heti két alkalommal. A teszteket irodalmi leírásokból vettük át (Altman és Sudarshan, 1975; Heath és Vink, 1997; Hill et al., 1991). A tesztek alkalmazását adolescens és felnőtt patkányok vizsgálatára ajánlják az irodalomban, ischaemiás agyi károsodást követően a funkcionális deficitek értékelésére, illetve féloldali léziót követően az asszimetrikus tünetek vizsgálatára (Aronowski et al., 1996; Borlongan et al., 1995; Heath és Vink, 1997; Markgraf et al., 1992; Reglődi et al., 2003; Rogers et al., 1997; van der Staay et al., 1996).

#### 2.4.1. Lépésszám és lépéshiba teszt

20x40 cm területű, 2x2 cm-es méterű rozsdamentes acélrácsra helyeztük az állatokat, melyet a talajszinttől 1 méter magasságba emeltünk (7. ábra). Egy perces időtartamig figyeltük az állat mozgását, feljegyeztük a mellső végtaggal végrehajtott összes lépés számát (külön számolva mindkét oldalt), illetve ezzel egyidőben számoltuk lépéshibáikat, azaz amikor a rács hézagaiba ejtették a lábukat, nem tudták megfogni a rácsot lépés közben. Ezt a lépéshibát mellső és hátsó végtagra is feljegyeztük, a jobb és bal oldalt külön.





*7. ábra: Lépésszám és lépéshiba teszt*

#### 2.4.2. Rota-rod (mókuskerék) teszt

Az állatkereskedelmi forgalomban is kapható 14 cm átmérőjű mókuskereket egy motorral hajtottunk meg 13 rpm sebességgel (8. ábra), és mértük azt az időt amennyit az állat a kerék tetején fenn tudott maradni (maximum időtartam 2 perc, ha az állat még ezután is fenn volt a keréken, akkor is befejeztük a vizsgálatot, és ezt a maximális időt írtuk fel). Ezt a tesztet három hetes korban kezdtük el, mivel ennél fiatalabb korban a patkányok egyáltalán nem képesek fenn maradni a keréken. A kísérletek egy részében a tesztet későbbi életkorban is elvégeztük, egészen 2 hónapos korig vizsgáltuk az állatokat.



*8. ábra: Mókuskerék teszt*

### 2.4.3. Mozgás iniciációs teszt

A patkányokat egy vízszintes felszínre helyeztük, melyen egy 10 cm-es belső, és egy 45 cm átmérőjű külső kör volt megjelölve (9. ábra). Mértük a mozgás kezdés idejét (ami alatt elhagyta a belső kisebb kör területét) és a nagyobb kör elhagyásának idejét is.

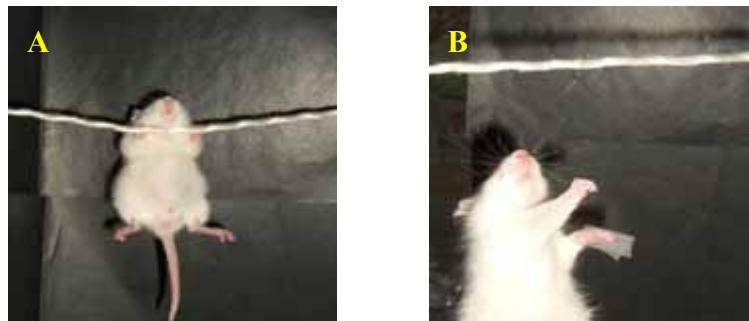


9. ábra: A mozgás iniciációs tesztben a belső kör elhagyása

### 2.4.4. Függeszkeszdesi teszt kötélén

Egy 40 cm magasságban vízszintesen kifüggesztett 4 mm átmérőjű nylon kötéltre helyeztük az állatok mellső végtagjait. Mértük azt az időt ameddig kapaszkodva fenn tudtak maradni a kötélén. Amennyiben az idő hosszabb volt mint 30 másodperc, vagy esetleg a kötélbe kapaszkodva annak végére mászva lejtött a berendezésről, a tesztet teljesítettnek vettük.

A hypoxiás/ischaemiás léziós csoportban elvégeztük a tesztet úgy is, hogy az állatok csak az egyik végtagjukkal kapaszkodhattak, mégpedig úgy, hogy a lekötéshez képest ipszilaterális mancsukat (a bal) leragasztottuk, hogy ne tudjanak fogni vele (10. ábra).



10. ábra: Kötélén függeszkeszdesi tesztek, A: mindkét mellső végtag, B: csak kontralaterális végtaggal.

#### 2.4.5. Kapaszkodási teszt megdöndött deszkán

45°-ban döntött farostlemez deszkára helyeztük az állatokat, majd 5 fokként emeltük a dőlésszöget (11. ábra). Azt a fokot jegyeztük fel, ahol az állatok még fenn tudtak maradni a deszkán legalább 5 másodpercig.



*11. ábra: Kapaszkodási teszt.*

#### 2.4.6. Függőleges rács teszt

A patkányokat egy 50x22 cm-es méretű, 15 mm-es rácsközű rács közepére helyeztük vízszintes helyzetben, majd a rácsot függőleges helyzetbe hoztuk kb. 2 másodperc alatt, ezt követően még 5 másodpercig figyeltük. Ha az állat 5 másodperc után is fennmaradt a rácson, akkor 0; ha a megfigyelési idő alatt, 1; ha azonnal, vagy még a vízszintből függőleges helyzetbe hozás közben leesett, 2 pontot adtunk teljesítményére.

#### 2.4.7. Testkilengés teszt

A patkányokat farkuknál fogva a levegőbe emeltük, de az asztallaptól nem távolítottuk messzebb, mint 3-5 cm. 30 másodpercen át figyeltük az állatok magatartását. Feljegyeztünk ezalatt minden, a függőlegeshez képest körülbelül 10 foknál nagyobb elmozdulást mindkét irányba. Csak az számított külön lengésnek amit az állat függőleges testhelyzetből indított.

#### 2.4.8. Rúdon egyensúlyozás teszt

Az állatokat egy négyszögletes alakú rúdra helyeztük (1x1x40 cm, a talajtól 40 cm magasságban), a rúd végein 2 platform, melyekre kimászhattak. Mértük azt az időt amíg fenn tudtak maradni a rúdon. Maximum 120 másodperc állt rendelkezésre, ha addig fennmaradtak, vagy időközben a két végén levő platformra másztak át, akkor a maximális időt írtuk fel.

### **2.5. Open-field teszt**

Az állatok motoros és felfedezési viselkedését vizsgáltuk ezzel a teszttel, általában 3-6 hetes korig. A patkányokat egy nyitott térbe helyeztük, ami egy 42×42 centiméteres, 31 centiméter magas fallal körülvevett doboz volt. A doboz alapját 8×8-as zónákra osztottuk. Az open-field megvilágítása egyenletes volt (200 lux). Az egyedeket a tér közepére helyeztük, mindig azonos irányba tekintve, majd 5 percig figyeltük őket (12. ábra). A későbbi analízis céljából mozgásukat videokamerával rögzítettük.



*12. ábra: Open-field teszt: a patkányokat a mező közepére helyezve indítottuk a motoros magatartás vizsgálatát. Szírozva a centrális mezők.*

A videó kiértékelése során feljegyeztük a mozgásuk során érintett mezőket, amelyekbe a két mellső végtagjukat behelyezték. Hasonlóképpen regisztráltuk az állatok minden fejemelését, ágaskodását (13. ábra), mosakodó mozgását és a fekális bólusok számát.

Ezek mellett a következő paramétereket számoltuk: az érintett mezők száma, ezáltal az összesen megtett távolság és az 5 percre vetített mozgási sebesség számítható, a centrális (középső 16 mező) és perifériás (külső 2 sor) zónákban (12. ábra) eltöltött idő, a falak mellett illetve a sarkokban eltöltött idő, és az egy zónában eltöltött leghosszabb idő.



13. ábra: Ágaskodó mozgás az open-field-ben.

## 2.6. Újdonságkereső viselkedés

Az újdonságkereső viselkedést egy, az open-field egyfajta variációjának megfelelő módszer segítségével vizsgáltuk. A tesztelés 3 hetes életkorban történt, az irodalomban közölt kísérleti protokollnak megfelelően (Heyser et al., 2004). A teszt 4 egymást követő 5 perces próbából épül fel, melyek között 3 perces szüneteket tartottunk. Minden próba után alapos takarítást végeztünk, hogy minimálisra szorítsuk a szagingerek hatását. A doboz alapterülete hasonlóan a korábban leírt open-fieldhez 42x42 cm, falai 31 cm magasak, elég nagy ahhoz, hogy az állatok ne tudjanak kimászni belőle.

Az 1. próba ismerkedési periódusként szolgált, nem helyeztünk tárgyakat a dobozba (14. ábra).



14. ábra

A 2. próbában két egyforma, rózsaszín, fehér tetővel rendelkező, homokkal töltött üvegtárggyal bővítettük a kísérleti elrendezést. A tárgyak henger alakúak, magasságuk 13 cm, átmérőjük 9 cm. Méretük és súlyuk akkora, hogy az állatok ne tudják elmozdítani, illetve ne tudjanak felmászni rájuk. Az üvegeket egymástól, és a falaktól is egyenlő távolságra helyeztük el (15. ábra). A kísérleti elrendezést változatlanul hagytuk a 3. próbában.



15. ábra

A 4. próba előtt az egyik, már az állat által ismert üveget eltávolítottuk, és helyére egy új, fehér oldalú, kék tetejű műanyag tartályt helyeztünk a dobozba. Alapja négyzetes, alapterülete 10x10 cm, magassága 22 cm (16. ábra).



16. ábra

Minden próba során kamerával rögzítettük az állatok viselkedését, majd olyan személy értékelt a videókat, aki nem ismerte a kezeléseket.

A következő paramétereket vizsgáltuk: mozgással töltött idő, kockaváltások száma, a centrumban és a periférián töltött idő. Központi zónának a tárggyal közvetlenül érintkező, és az ezekkel szomszédos kockákat tekintettük. A 4. próbában a régi és az új tárgy közelében eltöltött időt külön-külön értékeltük. A habituációs indexet az első 90 másodpercben megtett kockaváltások és az összes kockaváltások számának hányadosaként számítottuk ki.

## 2.7. Szövettan

### 2.7.1. A glutamát kezelés szövettani verifikációja

A kezelés hatásosságát igazoltuk a szövettani vizsgálattal. Jól ismert, hogy a neonatális glutamát kezelés súlyos idegsejtkárosodást hoz létre az agy különböző területein, a morfológiai eltéréseken kívül biokémiai változásokat is okoz (Beas-Zarate et al., 2002; Chaparro-Huerta et al., 2002; Gonzalez-Burgos et al., 2001; Ishikawa et al., 1997; Kubo et al., 1993; Pesini et al., 2004; Seress et al., 1984; Stricker-Krongrad és Beck, 2004; Tamás et al., 2004; van Rijn et al., 1986). Ezen elváltozások közül a nucleus arcuatus és a retina területén bekövetkezett neuronpusztulás vizsgálható a legjobban (Arees és Mayer, 1970; Heiman és Ben-Jonathan, 1983; Olney, 1969). Ezért mi is rutin szövettani és

immunhisztokémiai vizsgálatot végeztünk a nucleus arcuatusról. A retina degenerációt is vizsgáltuk, ezen kísérleteink azonban nem képezik tárgyát jelen PhD. dolgozatnak (Atlasz et al., 2008; Babai et al., 2005, 2006; Tamás et al., 2004).

A tesztek követően 6 hetes korban általános anaesthesia mellett 4% paraformaldehides fixáló oldattal perfundáltuk az állatokat. Agyukat eltávolítottuk, majd 50 mikrométer vastagságú frontális szeleteket készítettünk a hypothalamusból. A metszetek egy részét toluidinkékkel festettük, másik részét tirozin-hydroxiláz (TH) immunhisztokémiára dolgoztuk fel. Monoklonáris egér anti-TH antitest (1:1000, Sigma) volt a primér antitest, majd 48 óra 4 °C-on történt inkubációt követően 1 órán át másodlagos biotinilált antitesttel (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) és egy avidin-biotinilált peroxidáz komplexszel kezeltük az ABC kit utasításait követve (Vector Laboratories, Burlingame, CA) (Kiss et al., 2005; Tamás et al., 2004).

#### 2.7.2. Hypoxiás lézió szövettani vizsgálata

A viselkedési tesztek követően 6 hetes korban általános anaesthesia mellett 4% paraformaldehides fixáló oldattal perfundáltuk az állatokat, az agyukat eltávolítottuk majd 50 mikrométer vastagságú frontális szeleteket készítettünk vibratómmal. A metszeteket krezil-ibolyával festettük. A morfometriás mérésekhez összesen 20 metszetet készítettünk egy állatból, a Bregmához képest 3.8 mm-el előre elhelyezkedő síktól 5.2 mm-el a Bregma mögött levő síkig terjedő agyterületből 0.5 mm-es távolságokkal.

Digitális fotókat készítettünk egy Nikon FXA fotómikroszkóphoz kapcsolt digitális kamerával (Spot RT Color camera). Mértük a teljes agyterület nagyságát, és külön a cortex, hippocampus, striatum és az oldalkamra méretét mind kontra-, mind ipsilaterálisan a Scion Image számítógépes képanalizáló rendszer segítségével.

Az adatokat százalékosan fejeztük ki, a hypoxiás oldal nagyságát az ellenoldali éphez viszonyítva adtuk meg (Lubics et al., 2005).



## 2.8. Statisztikai elemzés

A fizikális jelek megjelenését ANOVA teszttel, majd az egyes csoportokat Newman-Keul post-hoc analízissel hasonlítottuk össze. A napi értékek összehasonlítására Student félé t-tesztet is használtunk. A negatív geotaxis, felegyenesedési reflex és az elmozdulási reflexidők napi értékeinek javulását ismételt varianciaanalízissel értékeltük, míg az egyes csoportok reflexidejét ugyancsak Newman-Keul teszttel vizsgáltuk a varianciaanalízist követően. Az állatok súlya és a neurológiai jelek megjelenése közötti korrelációt a Spearman-féle korrelációanalízissel végeztük. Az open-field teszt nonparametrikus adatait Kruskal-Wallis teszttel értékeltük, melyet Dunn post-hoc analízis követett. Az open-field parametrikus adatait, valamint az állatok súlyát Newman-Keul teszttel vizsgáltuk a varianciaanalízist követően. A hypoxiás állatok open-field tesztjének eredményeit Mann-Whitney teszttel hasonlítottuk össze.

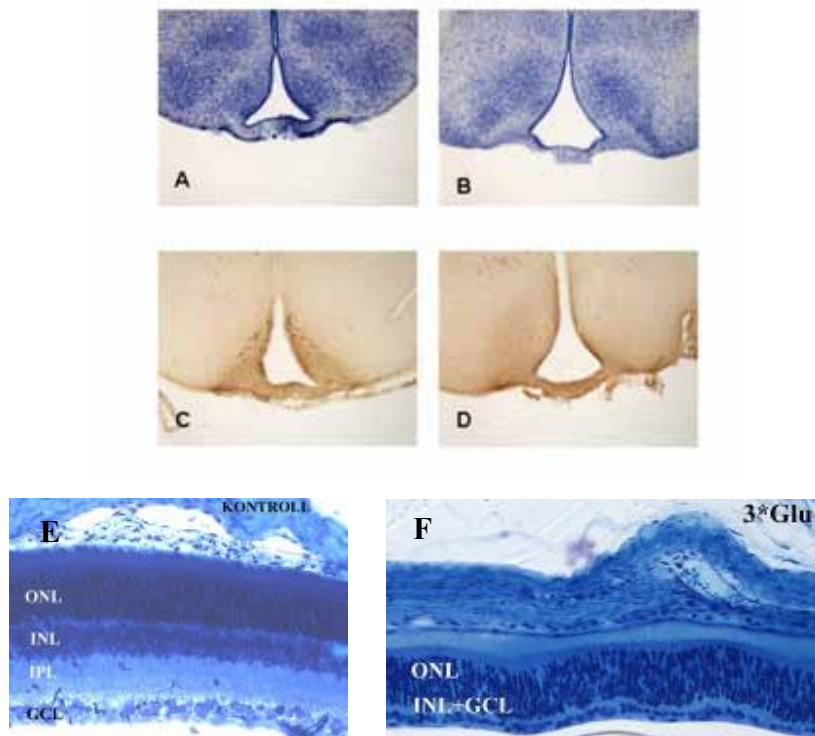
## 2.9. Kísérleti állatcsoportok

KEZELÉSI MÓD	ÁLLATSZÁM
<b>Nátrium-glutamát kezelés</b>	30 kezelt és 15 kontroll a neurológiai reflexek és a motoros koordináció tesztelésére 14 kezelt és 12 kontroll az open-field tesztekben 12 kezelt és 12 kontroll az újdonságkereső tesztben
<b>Hypoxia/ischaemia</b>	12 kezelt és 12 sham-operált állat neurológiai reflex, motoros koordináció és open-field tesztekben
<b>PACAP</b>	18 PACAP38, 20 PACAP6-38 és 14 kontroll a neurológiai reflexek és az open-field tesztben 15 MSG és PACAP38 kezelt állat neurológiai reflex és motoros koordinációs tesztekben
<b>Ingergazdag környezet</b>	8 kontroll és 4 MSG kezelt "ingerszegény", hagyományos ketrechen tartott, 12 kontroll és 16 MSG kezelt ingergazdag nagy ketrechen tartott állat neurológiai reflex, motoros koordinációs és open-field tesztekben

## 3. Eredmények

### 3.1. Glutamát kezelés

A többféle kipróbált kezelési protokoll közül az 1, 5, 9. napon adott 4 mg/testtömeg gramm dózisu kezelést használtuk. A kezelés során 2 kontroll és 12 kezelt patkány pusztult el, főleg az első hét során. A végleges (elhullás utáni) egyedszám 13 kontroll és 18 glutamát kezelt. Hasonlóan korábbi irodalmi leírásokhoz a hím és a nőstény egyedek között semmilyen jellegű eltérést nem találtunk ebben a kísérletben (Klingberg et al., 1987), így a két nem egyedeinek adatait nem választottuk külön. A szövettani analízis is kimutatta a kezelés sikerességét: jelentős neuronpusztulás igazolódott a nucleus arcuatus és a retina területén glutamát hatására (17. ábra).



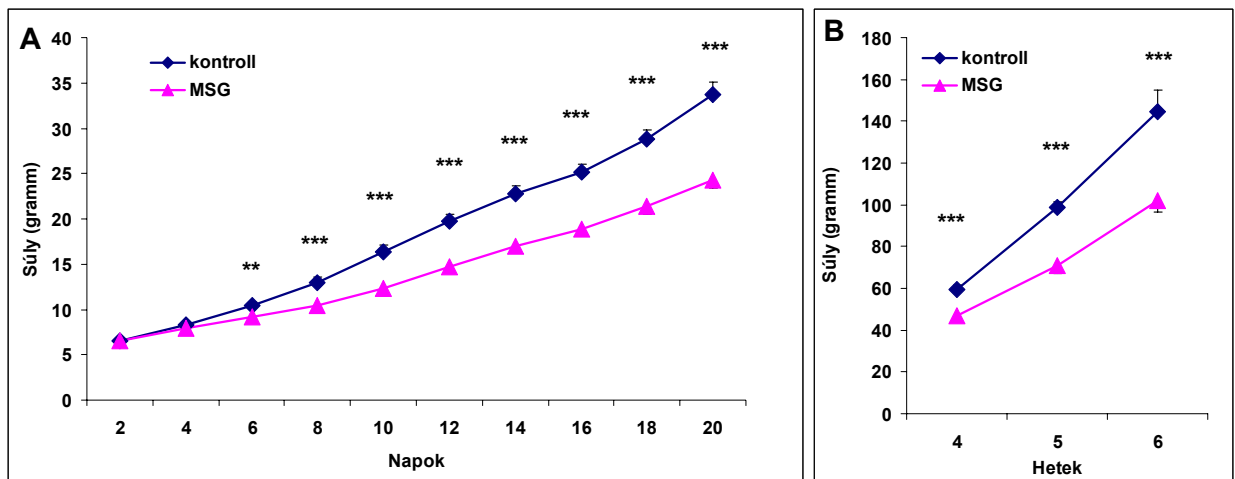
17. ábra: Kontroll (A, C) és glutamát kezelt állatok (B, D) hypothalamusáról készült fotó. Az "A" és "B" ábra toluidinkék festéssel, a "C" és "D" tirozinhidroxiláz (TH) immunfestéssel. E: ép retina, F: háromszori nagydózisú glutamát kezelt retina toluidinkék festéssel. ONL: külső magvas réteg, INL: belső magvas réteg, IPL: belső plexiform réteg, GCL: ganglionsejtek rétege.

### 3.1.1. Fizikális paraméterek

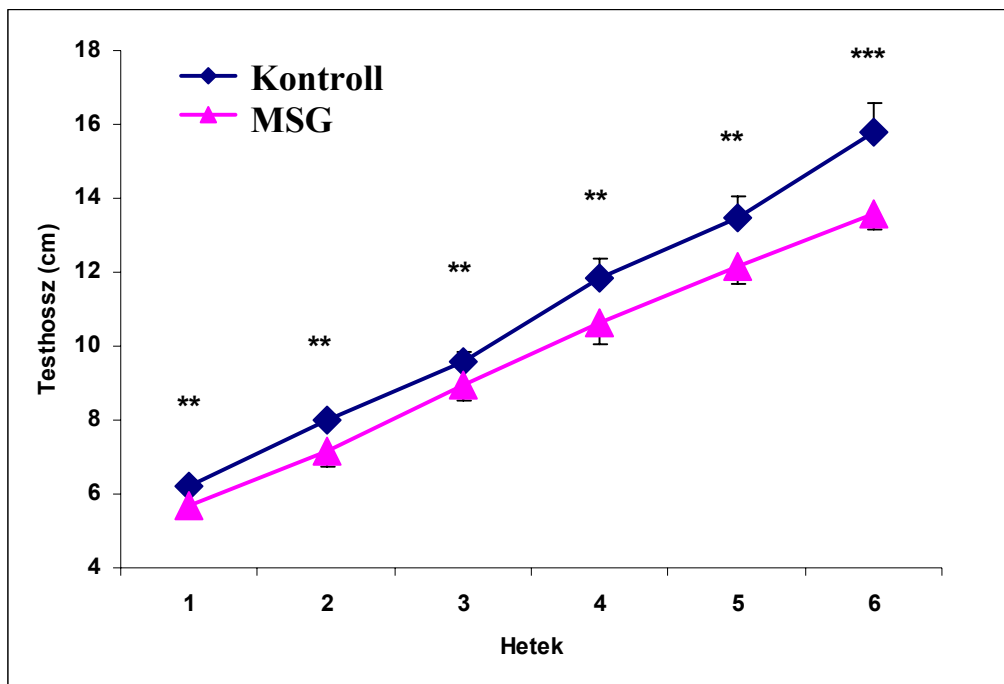
Nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a szomatikus fejlődésben vizsgált jelek megjelenésében, úgymint a szemnyitás, metszőfog kinövés, fül kiegyenesedés (I. táblázat). Ugyanakkor a glutamát kezelt állatok testsúly növekedése a 6. naptól jelentősen alacsonyabb volt a kontrollokhoz képest (18. ábra), és a növekedési zavar az állatok testhosszában is megnyilvánult, ugyanis az első hét végétől szignifikánsan rövidebb testhosszt értek el a kezelt egyedek (19. ábra).

**I. táblázat:** A fejlődési jelek megjelenésének napja kontroll és glutamát kezeléssel átesett állatokban. Átlag  $\pm$  SEM.

JEL	A megjelenés napja	
	Kontroll	Glutamát-kezelt
Szemnyitás	14.53 $\pm$ 0.18	13.94 $\pm$ 0.17
Metszőfog kinövés	9.84 $\pm$ 0.18	9.64 $\pm$ 0.18
Fül kiegyenesedés	13.23 $\pm$ 0.16	13.35 $\pm$ 0.11



18. ábra: Kontroll és glutamát-kezelt egyedek súlyának alakulása a megfigyelési időszak alatt. \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  a kontrollhoz képest.



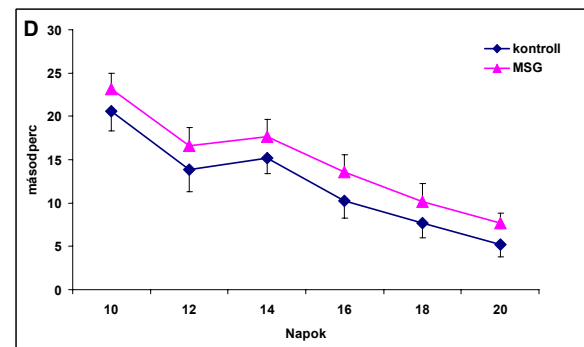
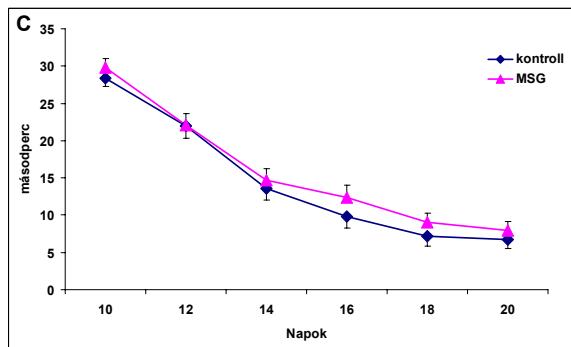
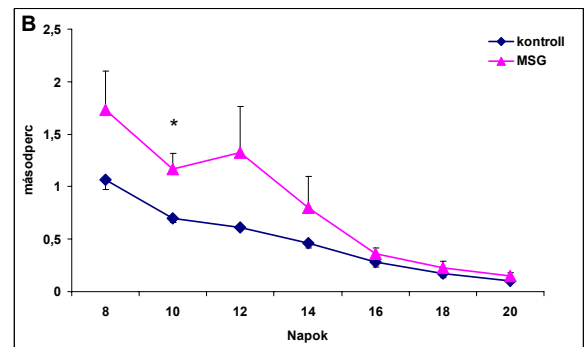
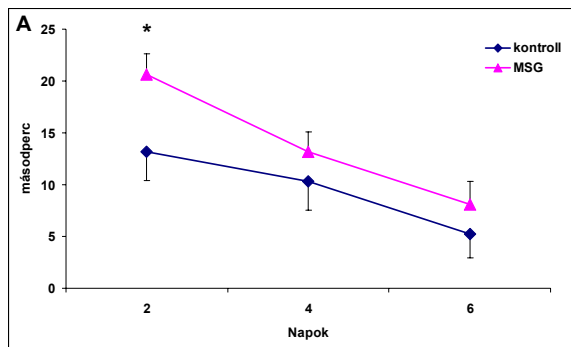
19. ábra: Átlagos testhossz az első 6 héten. \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  a kontrollhoz képest.

### 3.1.2. Neurológiai reflexek

A megfigyelt reflexek közül a mellső láb ráhelyezési- és fogóreflexe, valamint a felegyenesedési reflex (magasból leejtés, 2.3.1. b) szignifikánsan később jelent meg a glutamát kezelt állatoknál (II. táblázat). Egyéb reflexek is később jelentek meg, de a különbség nem volt szignifikáns. A teljesítmény progressziója hasonló volt a glutamát kezelt egyedek és a kontrollok esetében a megfigyelt 3 hét alatt, de bizonyos teszteknél a végrehajtási idő megnyúlt a kontrollokhoz képest. Alábbi tesztekben voltak különbségek: felegyenesedési reflex (megfordulás, 2.3.1. a) (20.A és 20.B ábra), negatív geotaxis és elmozdulási reflex (20.C és 20.D ábra). Nem a teljes periódusban, de néhány megfigyelési napon az eltérések statisztikailag is szignifikánsnak mutatkoztak.

**II. táblázat:** Neurológiai reflexek és fejlődési jelek megjelenése a kontroll és a glutamát kezelésen átesett állatokban. Átlag  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  a kontrollhoz képest.

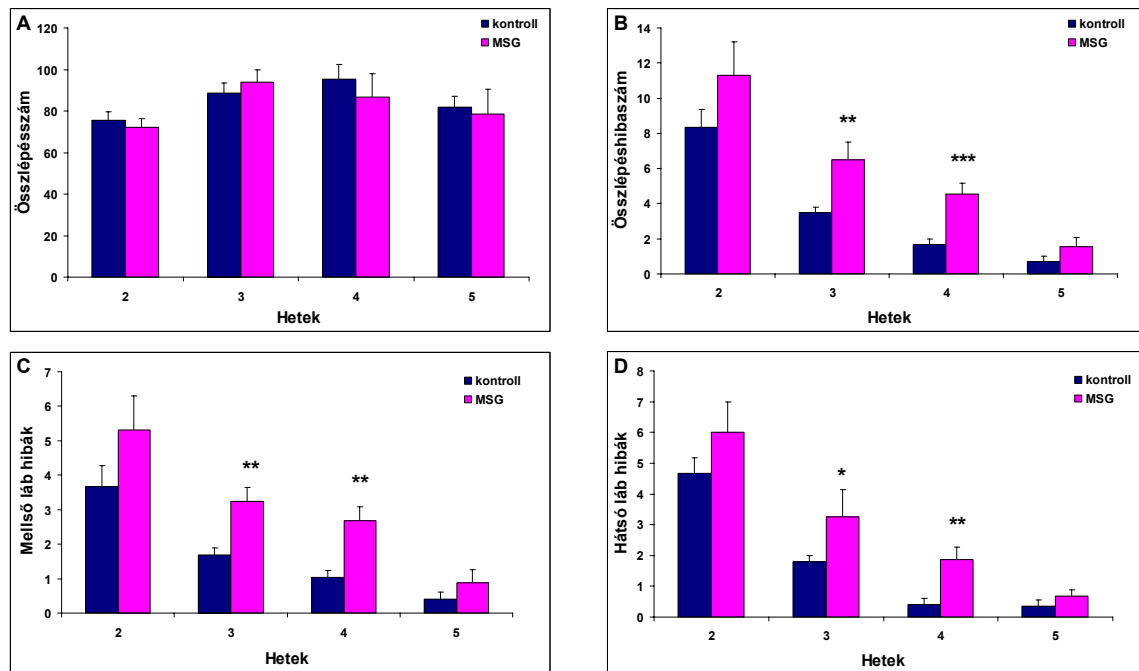
JEL	A megjelenés napja	
	Kontroll	Nátrium-glutamát
Negatív geotaxis	11.07 $\pm$ 0.32	11.76 $\pm$ 0.34
Fülrángás reflex	15.23 $\pm$ 0.50	15.00 $\pm$ 0.51
Szemháj reflex	12.92 $\pm$ 0.43	13.11 $\pm$ 0.20
Melső végtag ráhelyezés	10.46 $\pm$ 0.46	12.17 $\pm$ 0.32 **
Hátsó végtag ráhelyezés	20.15 $\pm$ 0.31	20.64 $\pm$ 0.20
Melső végtag fogó	6.15 $\pm$ 0.31	7.05 $\pm$ 0.32 *
Hátsó végtag fogó	8.31 $\pm$ 0.26	8.76 $\pm$ 0.32
Elmozdulási reflex	10.15 $\pm$ 0.63	10.12 $\pm$ 0.50
Akusztikus reflex	13.61 $\pm$ 0.21	13.94 $\pm$ 0.30
Felegyenesedés (b)	4.76 $\pm$ 0.30	6.35 $\pm$ 0.41 **



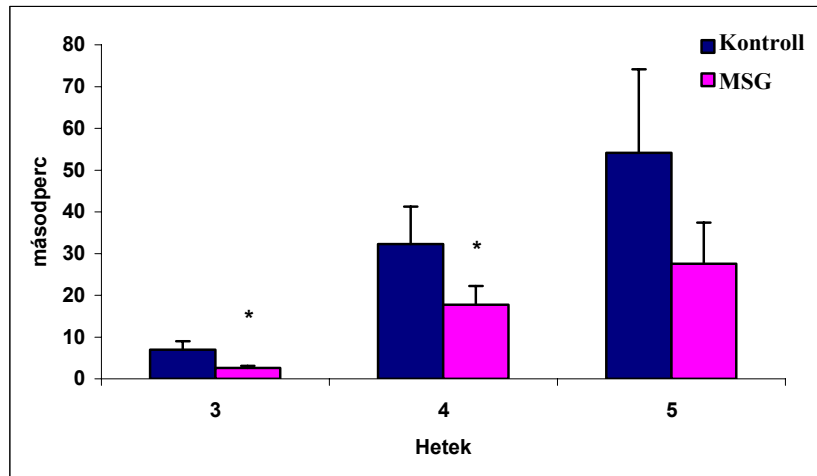
20. ábra: Teljesítési idők a különböző neurológiai reflexekben kontroll és glutamát kezelt patkányokban. (A-B) felegyenesedési reflex, (C) negatív geotaxis, (D) elmozdulási reflex. \* $P < 0.05$  a kontrollhoz képest.

### 3.1.3. Motoros koordináció

A lépésszámolós tesztekben a kontroll és glutamát kezelt állatok ugyanannyi lépést tettek meg egy perc alatt (21.A ábra). Ugyanakkor a lépéshibák száma magasabb volt a kezelt csoportban az 5 hetes megfigyelési periódus folyamán végig, statisztikailag is szignifikáns eltéréssel 3 és 4 hetes életkorban (21.B ábra). Mind a mellső, mind pedig a hátsó láb esetén megfigyelhető volt ez a megemelkedett hibaszám (21.C és 21.D ábra). A glutamát kezelt egyedek rosszabb teljesítményt nyújtottak a mókuseréken is, ahol szignifikánsan kevesebb ideig tudtak a forgó keréken maradni, mint kontroll társaik (22. ábra).



21. ábra: Lépéshiba a kontroll és glutamát kezelt csoportban a posztnatális 5. hétig. (A) összlépésszám, (B) összlépéshiba, (C) mellső végtag lépéshiba, (D) hátsó végtag lépéshiba. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  a kontrollhoz képest.



22. ábra: Mókuserék tesztteljesítmény kontroll és glutamát kezelt állatokban 3-5 hetes korban. \* $P < 0.05$  a kontrollhoz képest.

Az egyéb motoros koordinációs tesztek esetén nem volt kimutatható jelentős eltérés a két állatcsoport között. A mozgás iniciációs tesztben az egyedek a megfigyelt 5 hét során folyamatos fejlődést mutattak teljesítményükben mindkét csoportban, de egyik időpontban sem volt szignifikáns különbség a csoportok között (III. táblázat). Annak ellenére, hogy a kontroll egyedek mind egy, mind páros mellső végtaggal történő függeszkedésben hosszabb ideig tudtak a kötélen maradni majdnem minden tesztpontban, és több kontroll egyed érte el a megadott időlimitet (30 másodperc), az eltérések nem bizonyultak statisztikailag szignifikánsnak (III. táblázat). Ugyanilyen eredményt kaptunk a megdöntött deszkán vizsgált kapaszkodási tesztben, ahol mind a kontroll, mind a glutamát kezelt csoport fennmaradt a deszkán 5 másodpercnél hosszabb ideig a vizsgált 5 hét során, szignifikáns különbségek nélkül.

**III. táblázat:** Mozgás iniciáció és kötélén függeszkedés az első 5 héten. Átlag  $\pm$  SEM.

Jel	Kontroll	Glutamát
	Másodperc	
<b>Mozgás iniciáció (belső kör)</b>		
2 hét	12.20 $\pm$ 5.30	6.05 $\pm$ 1.67
3 hét	1.63 $\pm$ 0.46	2.16 $\pm$ 0.70
4 hét	0.99 $\pm$ 0.23	2.64 $\pm$ 1.21
5 hét	2.01 $\pm$ 0.62	0.97 $\pm$ 0.13
<b>Mozgás iniciáció (külső kör)</b>		
2 hét	38.04 $\pm$ 10.27	31.14 $\pm$ 11.70
3 hét	16.74 $\pm$ 4.83	19.36 $\pm$ 10.28
4 hét	21.05 $\pm$ 7.37	33.19 $\pm$ 12.90
5 hét	11.55 $\pm$ 2.48	17.90 $\pm$ 4.78
<b>Kötélén függeszkedés (páros végtaggal)</b>		
2 hét	20.26 $\pm$ 2.82	20.82 $\pm$ 2.80
3 hét	27.58 $\pm$ 2.40	22.28 $\pm$ 4.00
4 hét	30.00 $\pm$ 0.00	27.04 $\pm$ 1.95
5 hét	30.00 $\pm$ 0.00	28.29 $\pm$ 1.74
<b>Kötélén függeszkedés (egy végtaggal)</b>		
2 hét	9.69 $\pm$ 3.50	9.66 $\pm$ 1.46
3 hét	18.37 $\pm$ 8.67	14.53 $\pm$ 4.30
4 hét	26.86 $\pm$ 2.00	16.22 $\pm$ 5.19
5 hét	25.11 $\pm$ 2.40	23.10 $\pm$ 2.70



#### 3.1.4. Open-field magatartás

Az open-field aktivitás adatait a IV. táblázatban foglaltuk össze. A teljes mozgással töltött idő, a mozgás során érintett zónák száma, a teljes megtett távolság és az ezekből számolható mozgási sebesség a lokomotoros aktivitás jellemzői ebben a tesztben. Általánosságban a glutamát-kezelt állatok az első 3 posztnatális héten aktívabbak voltak, különösen aktívak voltak a kontrollhoz képest 2 hetes korban, amikor a kontroll egyedek még nagyon keveset mozogtak. A mozgással töltött idő és a mozgás során érintett terület nagysága több mint duplája volt a kontroll állatokénak. Tekintve, hogy a mozgási sebesség nem különbözött a két állatcsoportban, ezért a megnövekedett sebesség nem lehetett a nagyobb megtett távolság oka. Három hetes életkorban mindkét csoport aktivitása szignifikánsan megemelkedett a 2 hetes eredményhez képest. A glutamát kezelt csoportban a mozgási sebesség jelentősen nagyobb volt a kontroll patkányok sebességénél, és ez a mozgással töltött azonos idő ellenére is nagyobb bejárt területet eredményezett a mozgás során. Négy hetesen a legtöbb különbség eltűnt. A glutamát-kezelt állatok lassabbak lettek, nem volt eltérés a mozgás során érintett terület nagyságában. Ugyanígy 6 hetesen sem volt különbség a két csoport között, míg 8 hetes életkort elérve a glutamát-kezelt egyedek már kevesebbet mozogtak a kontrollokhoz képest. A vertikális irányú mozgások megfigyelése során az ágaskodások száma azonos volt a két csoportban a megfigyelési idő legnagyobb részében. Egyedül a fejemelgetések számában volt eltérés, ugyanis 3 hetes életkorban a glutamát-kezelt állatok kevesebb fejemelgetés mellett több ágaskodási magatartást mutattak. Nem mutatkozott eltérés a mosakodási magatartásban és a habituációs indexben. A fal mellett töltött idő aránya (thigmotaxis) 2 hetes korban magasabb volt a glutamát-kezelt patkányokban, de ez annak tudható be, hogy a kontroll egyedek nagy része olyan keveset mozgott, hogy el sem mászott a falig az open-field közepétől indulva. Az ezt követő hetekben mindig a glutamát-kezelt állatok voltak kevesebbet a falak mentén.

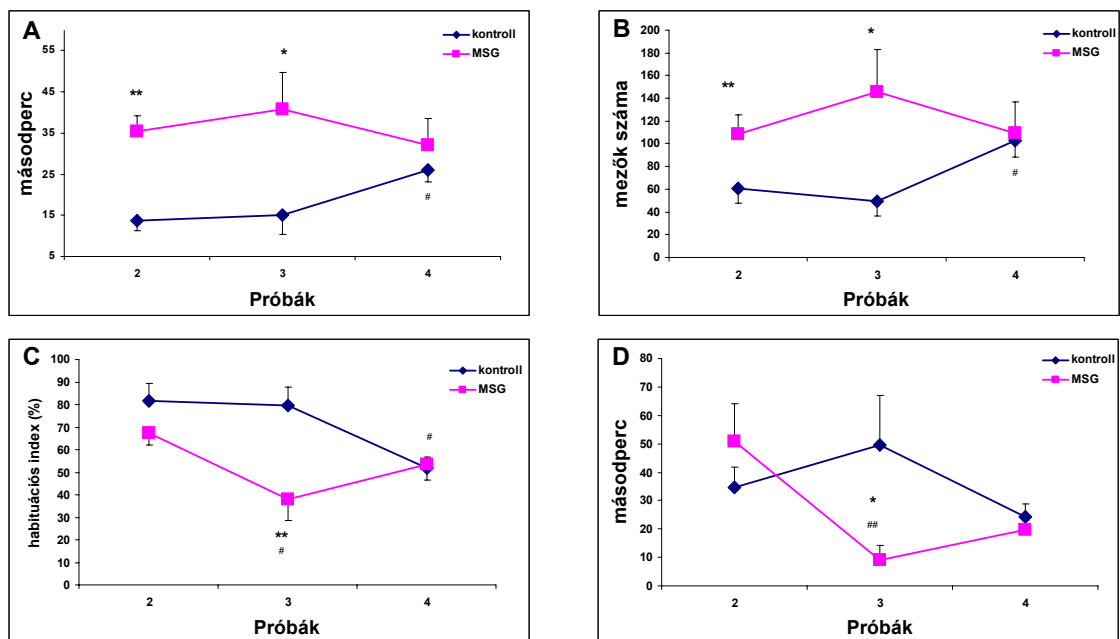
**IV. táblázat:** Open-field aktivitás a kontroll és a glutamát-kezelt csoportban 2, 3, 4, 6 és 8 héttel születés után. Átlag  $\pm$  SEM. \*P<0.05, \*\*P<0.01 a kontrollhoz képest.

Jel	2 hét		3 hét		4 hét		6 hét		8 hét	
	Kontroll	MSG	Kontroll	MSG	Kontroll	MSG	Kontroll	MSG	Kontroll	MSG
<b>Mozgással töltött idő (másodperc)</b>	28.1 $\pm$ 8.7	64.6 $\pm$ 10.1*	108.4 $\pm$ 19.2	133.9 $\pm$ 10.1	136.8 $\pm$ 16.9	146.3 $\pm$ 8.1	97.5 $\pm$ 15.2	105.5 $\pm$ 13.4	98.8 $\pm$ 6.9	86.8 $\pm$ 3.5
<b>Keresztezett mezők száma</b>	10.4 $\pm$ 2.9	29.2 $\pm$ 5.4*	114.3 $\pm$ 20.0	165.8 $\pm$ 12.7*	231.0 $\pm$ 30.4	212.7 $\pm$ 12.1	147.0 $\pm$ 24.2	147.7 $\pm$ 19.7	175.4 $\pm$ 12.7	138.8 $\pm$ 6.5*
<b>Megtett táv (cm)</b>	58.6 $\pm$ 16.6	164.2 $\pm$ 30.7*	639.1 $\pm$ 110.0	926.1 $\pm$ 71.5*	1295.3 $\pm$ 170.0	1213.7 $\pm$ 68.1	826.7 $\pm$ 136.3	830.4 $\pm$ 138.7	986.6 $\pm$ 71.5	780.1 $\pm$ 36.4*
<b>sebesség (cm/min)</b>	128.9 $\pm$ 12.7	144.9 $\pm$ 10.8	332.7 $\pm$ 38.4	415.3 $\pm$ 20.2*	576.8 $\pm$ 36.8	500.0 $\pm$ 14.7*	500.2 $\pm$ 25.2	463.9 $\pm$ 30.8	611.1 $\pm$ 45.7	541.0 $\pm$ 17.3
<b>Fejmelgetés</b>	3.8 $\pm$ 0.7	7.1 $\pm$ 1.3	31.1 $\pm$ 4.8	17.3 $\pm$ 2.3**	28.3 $\pm$ 3.3	22.0 $\pm$ 0.5	22.4 $\pm$ 2.8	17.9 $\pm$ 2.4	21.4 $\pm$ 1.7	20.1 $\pm$ 2.0
<b>Ágaskodás</b>	0.4 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.6	9.3 $\pm$ 2.9	13.8 $\pm$ 0.9	16.6 $\pm$ 2.7	19.1 $\pm$ 2.4	14.2 $\pm$ 2.9	15.3 $\pm$ 2.7	16.4 $\pm$ 1.6	14.6 $\pm$ 2.2
<b>Mosakodás (másodperc)</b>	33.5 $\pm$ 9.7	35.1 $\pm$ 5.1	48.4 $\pm$ 13.7	35.6 $\pm$ 8.6	18.1 $\pm$ 4.3	13.4 $\pm$ 3.1	14.5 $\pm$ 7.0	7.8 $\pm$ 3.1	16.8 $\pm$ 5.9	15.4 $\pm$ 3.0
<b>Habitáció (%)</b>	52.4 $\pm$ 13.3	51.9 $\pm$ 9.8	40.2 $\pm$ 9.1	37.7 $\pm$ 1.8	34.8 $\pm$ 4.3	35.7 $\pm$ 1.5	27.4 $\pm$ 3.5	32.6 $\pm$ 1.9	34.5 $\pm$ 3.5	34.7 $\pm$ 2.3
<b>Fal mellett töltött idő (másodperc)</b>	144.3 $\pm$ 42.2	230.4 $\pm$ 19.9	248.8 $\pm$ 17.9	200.3 $\pm$ 17.8*	227.1 $\pm$ 12.8	190.1 $\pm$ 7.6*	236.1 $\pm$ 11.4	208.6 $\pm$ 15.7*	239.3 $\pm$ 11.0	202.3 $\pm$ 6.6**

### 3.1.5. Újdonságkereső magatartás (novelty-seeking)

Ennek a magatartásnak a vizsgálatához külön állatcsoportokat használtunk. Az újdonságkereső magatartási tesztek eredményeit a 23. és 24. ábrán foglaltuk össze. Csak a 2-4. próba eredményeit ábráztuk, tekintve, hogy az első csak az állat akklimatizálására szolgált. A 2. és 3. próba során, mikor ugyanaz a tárgy volt a térbe helyezve, nem volt eltérés ugyanazon csoportok egyedei között, de összességében a glutamát-kezelt csoport szignifikánsan aktívabbnak bizonyultak a kontrollcsoportnál (23.A ábra). A kontroll patkányok aktivitása jelentősen emelkedett a 4. próba során, mikor behelyeztük az új tárgyat. A glutamát-kezelt egyedeknél pedig pont ellentétesen, csökkent az aktivitás a 4. próba során. Ugyanilyen eredményt kaptunk a mozgás során érintett mezők számának elemzésekor, ahol a 2. és 3. próba során a glutamát-kezelt csoport érintett több mezőt mozgása során, nagyobb területet jártak be a kontroll állatokhoz viszonyítva, míg a 4. próba során kevesebb mezőt érintettek (23.B ábra). A kontroll csoport egyedeinek habituációs indexe nem változott a 2. és 3. próba során, és

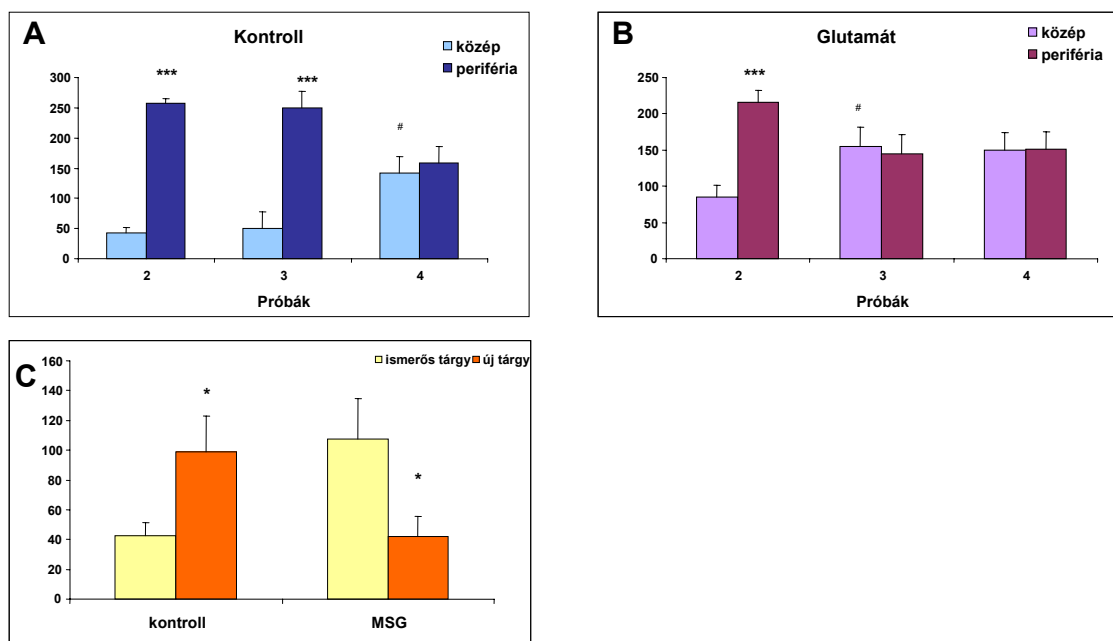
összességében nézve az állatok az egyes próbák első 90 másodpercében mozogtak a legtöbbet (23.C ábra). A habituáció szignifikánsan lecsökkent a 4. próbában, az állatok nagyjából ugyanolyan aktivitással mozogtak a megfigyelés teljes időtartamában, mint az első 90 másodpercben. A glutamát-kezelt egyedek ellentétes mintázatot mutattak, ugyanis lecsökkent a habituáció a 3., majd megemelkedett a 4. próba során (23.C ábra). A mosakodó magatartás is ellentétes volt a két csoport között (23.D ábra). A kontroll állatok több időt töltöttek mosakodással a 3. próba során, mikor a mozgáster nem tartalmazott számukra újdonságot, és kevesebb időt töltöttek mosakodással a 4. próba során, mikor behelyeztük az új tárgyat, azonban ez az eltérés a két próba között statisztikailag nem volt szignifikáns. A glutamát-kezelt csoport egyedei szignifikánsan kevesebbet mozogtak a 3. próba során, és többet a 4. próba során.



23. ábra: Mozgással töltött idő (A), érintett mezők száma (B), habituációs index (C) és összesmosakodásszám (D) a kontroll és a glutamát-kezelt csoportok újdonságkereső magatartása során a 2-4. próba folyamán. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  a kontrollhoz képest, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  ugyanazon csoporton belül az előző próbához hasonlítva.

A közepen (vagyis az új tárgy közelében), és a periférián eltöltött idő arányának összehasonlításakor előtűnt, hogy a 2. próba során minden állat több időt töltött a periférián, mint közepen (24.A és 24.B ábra). Ez az arány a kontroll egyedekben nem

változott meg a 3. próba során sem, de a középen töltött idő szignifikánsan megemelkedett a 4. próba folyamán (24.A ábra). A 4. próbában a középen és a periférián töltött idő hozzávetőlegesen megegyezett, az állatok tehát szignifikánsan több időt töltöttek el a behelyezett új tárgy közelében. A glutamát-kezelt patkányoknál a középen és a periférián töltött idő nagysága már a 3. próba során körülbelül megegyezett (24.B ábra). Ezek az állatok a 4. próbában sokkal kevesebb időt töltöttek az új tárgy mellett, mint a kontroll egyedek (24.C ábra).



24. ábra: A középen és periférián eltöltött idők aránya újdonságkereső magatartás közben a 2-4. próba során kontroll (A) és glutamát-kezelt egyedekben (B), valamint a 4. próbában a kontroll és kezelt állatoknál a régi és az új tárgy közelében eltöltött idő (C).

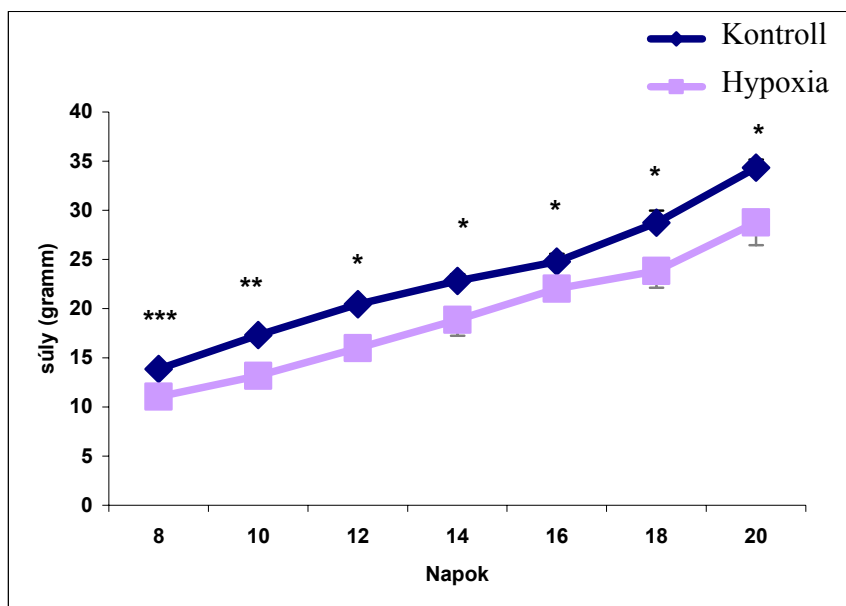
Az "y" tengelyen az időt ábrázoltuk másodpercekben.

\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  a kontrollal összehasonlítva, # $P < 0.05$  ugyanazon csoporton belül az előző próbához hasonlítva.

## 3.2. Hypoxia/ischaemia modell

A beavatkozást követő 24 óraban 2, majd a harmadik posztoperatív héten 1 hypoxiás/ischaemiás állat pusztult el, míg kontroll egyed egy sem. A rövid műtéti időtartam miatt egy állatot sem kellett kizárni a kísérletből testhőmérséklet változás miatt. A lehűlt állatokat ugyanis a hypothermia neuroprotektív hatása miatt a kísérletből ki kell zárni.

A szomatikus fejlődés zavarát jelzi, hogy a hypoxiás állatok testsúlygyarapodása szignifikánsan alacsonyabb a kontrollokéhoz képest az egész megfigyelési periódus alatt (25. ábra). Az állatok születési súlya, és a műtét előtt mért súlya megegyezett.



25. ábra: A hypoxiás és kontroll állatok súlya 8 napos életkortól (első posztoperációs nap). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  a kontrollhoz képest.

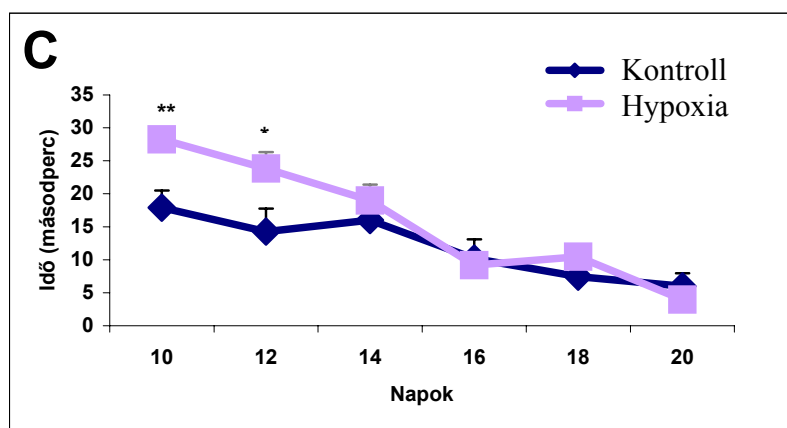
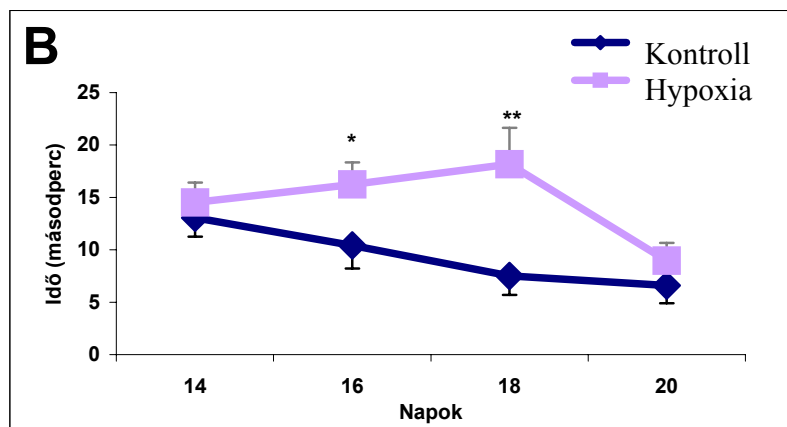
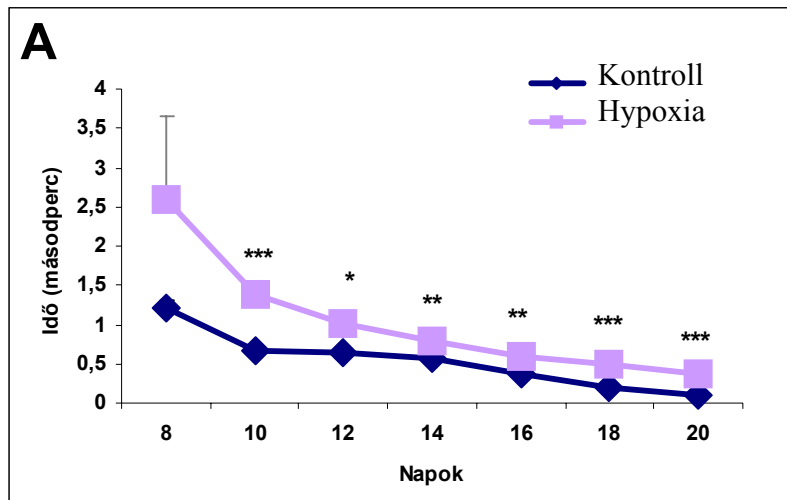
### 3.2.1. Neurológiai reflexek

Ahogy az V. táblázatban szerepel, csak a szemnyitás napja késett a vizsgált fizikális paraméterek közül a hypoxiás állatoknál a kontrollokhoz képest.

**V. táblázat:** Fizikális paraméterek és reflexek megjelenésének napja kontroll és hypoxiás patkányoknál. Átlag  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  a kontrollhoz képest.

Jel	Megjelenés napja	
	Kontroll	Hypoxia/ischemia
Szemnyitás	14.6 $\pm$ 0.2	15.2 $\pm$ 0.2 *
Metszőfog kinövés	9.7 $\pm$ 0.2	9.2 $\pm$ 0.1
Fül kiegyenesedés	13.2 $\pm$ 0.2	13.7 $\pm$ 0.3
Negatív geotaxis	11.0 $\pm$ 0.4	12.7 $\pm$ 0.5 **
Keresztezett extenzor reflex	9.3 $\pm$ 0.2	8.6 $\pm$ 0.1
Fülrángás reflex	15.6 $\pm$ 0.7	17.1 $\pm$ 0.7 *
Szemhéj reflex	12.4 $\pm$ 0.5	12.3 $\pm$ 0.2
Mellső láb ráhelyezés	10.5 $\pm$ 0.6	9.6 $\pm$ 0.3
Hátsó láb ráhelyezés	20.2 $\pm$ 0.4	20.1 $\pm$ 0.1
Mellső láb fogó	6.3 $\pm$ 0.4	8.1 $\pm$ 0.1 ***
Hátsó láb fogó	8.2 $\pm$ 0.3	10.0 $\pm$ 0.2 ***
Elmozdulási	9.8 $\pm$ 0.8	11.6 $\pm$ 0.5 *
Akusztikus	13.5 $\pm$ 0.2	13.5 $\pm$ 0.3

Emellett egyes neurológiai reflexek, mint a negatív geotaxis, a fülrángás, a mellső és hátsó végtagi fogóreflex, valamint az elmozdulási reflex jelent meg szignifikánsan később. A hypoxiás/ischemiás sérülés nem csak a reflex megjelenését késleltette, de a végrehajtás ideje is szignifikánsan hosszabb volt a kontrollok reflexidejéhez képest a felegyenesedési reflex (megfordulás, 2.3.1. a) (26.A ábra), negatív geotaxis (26.B ábra), elmozdulási reflexekben (26.C ábra). Ugyanakkor viszont a megfigyelési idő végére a hypoxiás csoport egyedei beérték teljesítményükben a kontrollokat.



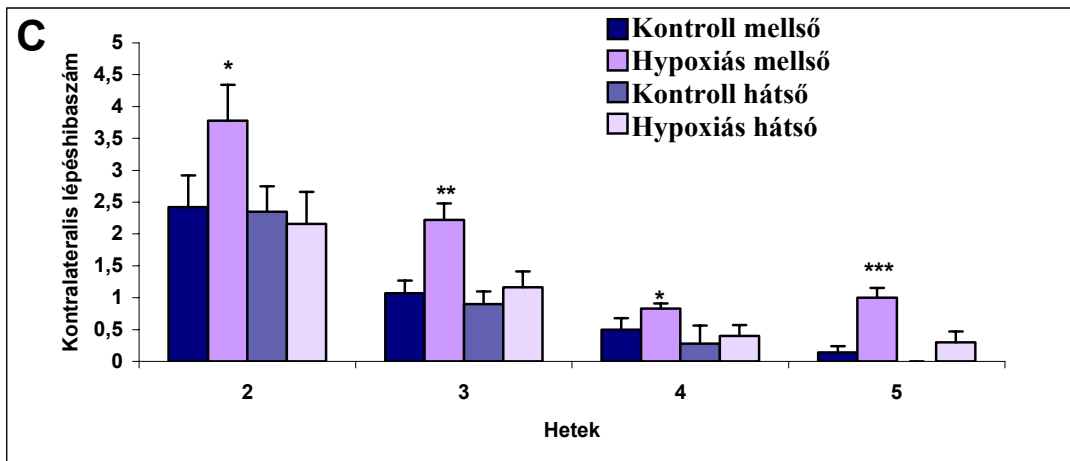
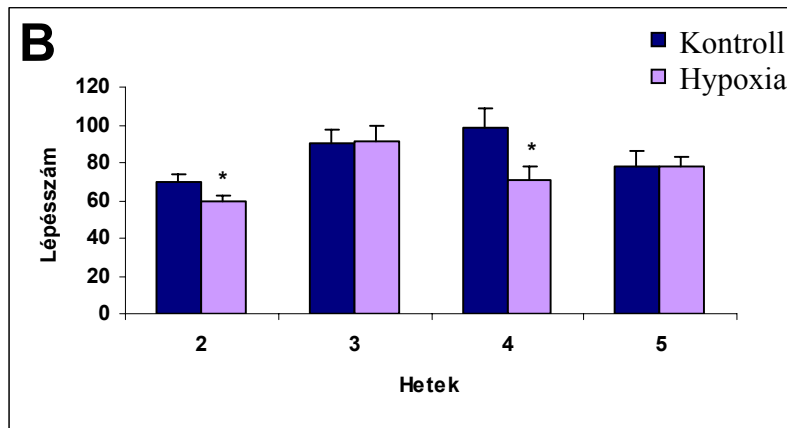
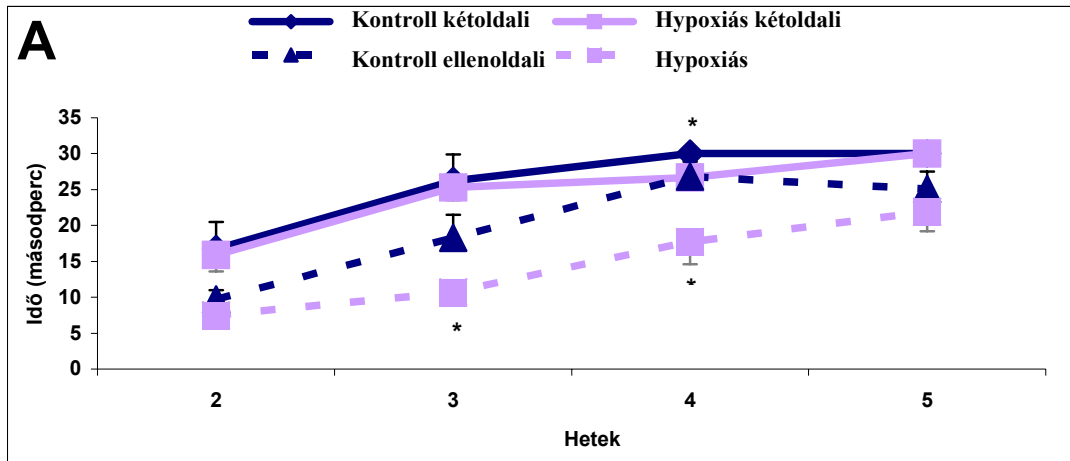
26. ábra: Napi teljesítmény a felegyedési reflex (A), negatív geotaxis (B) és elmozdulási reflex (C) esetén kontroll és hypoxiás patkányoknál. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  a kontrollhoz képest.

### 3.2.2. Motoros koordináció

A kötélén függeszkedés tesztben a hypoxiás állatok szignifikánsan kevesebb ideig maradtak a kötélén, előbb leestek 3 és 4 hetes életkorban, mint a kontrollok akkor, ha csak a kontralaterális (jobb) mellső végtagjukat használhatták. Két mellső végtag használata esetén csak 4 hetesen volt jelentős eltérés a két csoport közt (27.A ábra). Meglepőnek találtuk, hogy a mókuserék teszt nem mutatott szignifikáns különbséget a kontroll és hypoxiás állatok teljesítménye közt egyik héten sem. A lépésszámolás-lépéshiba tesztben a hypoxiás csoport egyedei szignifikánsan kevesebbet léptek 2 és 4 hetes korban (27.B ábra). A lépéshibák abszolút számértéke hasonló volt a kontroll és a hypoxiás csoportban az ipsilaterális végtagoknál, azonban míg a kontroll állatok ugyanannyit hibáztak bal és jobb oldali végtagjukkal, addig a hypoxiás egyedek jelentősen többet hibáztak a kontralaterális mellső végtagjukkal a megfigyelési idő során (27.C ábra). Nem volt szignifikáns különbség a két csoportban a hátsó végtaggal végrehajtott lépéshibaszámban (27.C ábra).

A kapaszkodási tesztben csak 2 hetes korban volt szignifikáns különbség: a maximális dőlésszög, ahol az állatok fenn tudtak maradni  $46.1 \pm 1.9$  volt a kontroll, és  $36.9 \pm 2.1$  volt a hypoxiás állatoknál. Ehhez a teljesítményhez képest a kontroll egyedek sem mutattak fejlődést a további hetek során, míg hypoxiás társaik 3 hetes korukra utolérték teljesítményben a kontrollokat. A függőleges rács teszt nem bizonyult megfelelőnek, mivel az összes állat fenn tudott maradni a rácson kezeléstől függetlenül. Hasonlóan a testkilengés tesztben sem kaptunk szignifikáns eltérést. Nem volt semmilyen különbség abban, hogy balra vagy jobbra lengenek az állatok, illetve a 3 hetes állatok megfordulva elérték és belekapaszkodva saját farkukba felmászottak a vizsgáló kezére. A rúdon egyensúlyozásban is csak 2 hetesen volt különbség a kontroll és a hypoxiás patkányok között: a kontrollok  $62.4 \pm 11.2$  másodpercig, míg a hypoxiások  $28.2 \pm 7.2$  másodpercig tudtak fennmaradni a rúdon. A későbbi életkorban az összes állat fennmaradt a teljes 2 perces megfigyelési idő folyamán, vagy lemászott a rögzítő platformra.

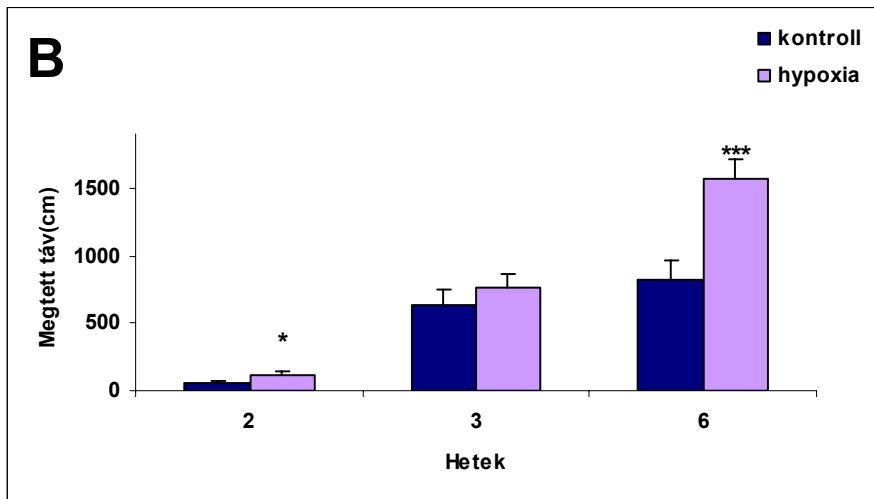
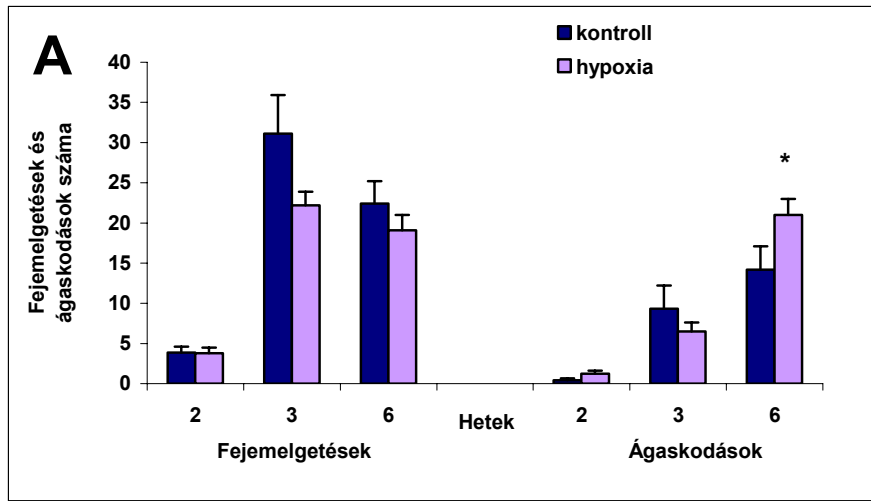




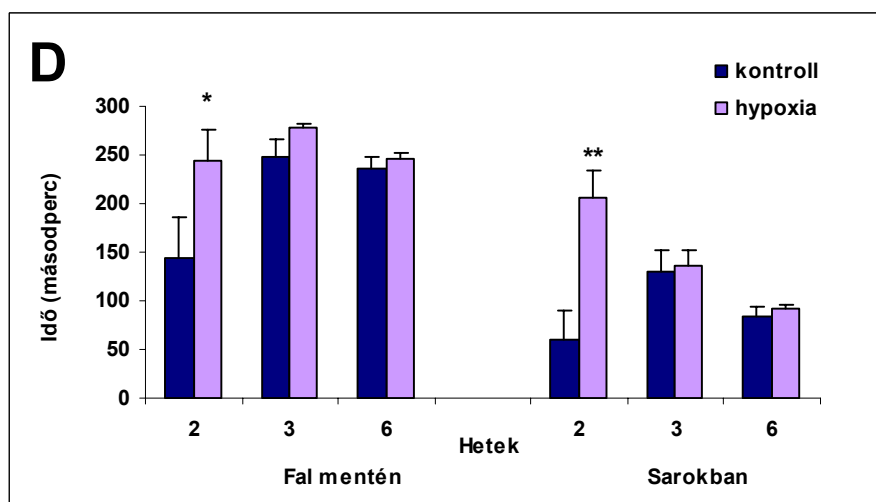
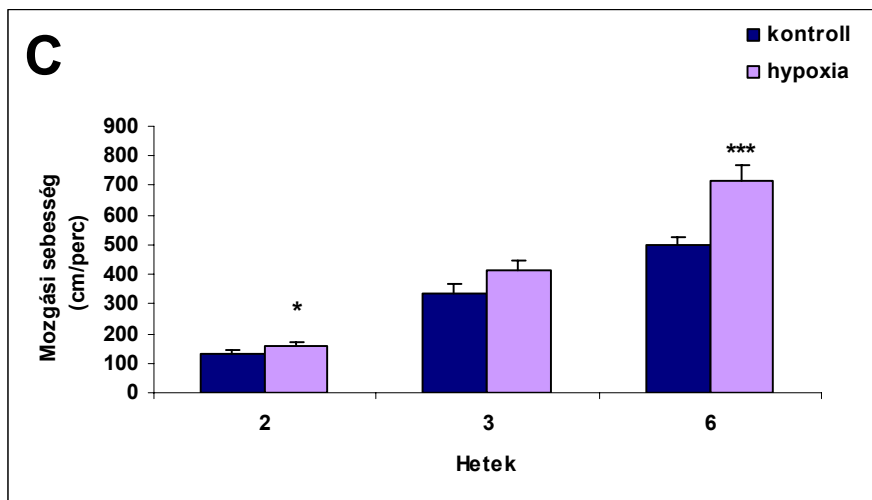
27. ábra: Normál és hypoxiás állatok motoros koordinációs tesztekben nyújtott teljesítménye. (A) Kötélen kapaszkodás mindkét, vagy kontralaterális végtaggal (jobb). (B) Összlépésszám a lépéshiba tesztben. (C) Kontralaterális (jobb oldali elülső és hátsó végtagok) lépéshibaszámok. \* $P < 0.05$ \*\*,  $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  a kontrollhoz képest.

### 3.2.3. Open-field aktivitás

Nem találtunk durva eltéréseket az állatok általános aktivitása és mozgásmintázata tekintetében a két csoport között. Az állatok nagyon keveset mozogtak 2 hetes korban. A fejemelgetések és ágaskodások száma 3 hetes korra szignifikánsan megemelkedett, de nem volt jelentős eltérés a kontroll és hypoxiás állatok között (28.A ábra). Hat hetes korban csak az ágaskodások száma emelkedett tovább, és a hypoxiás patkányok szignifikánsan többet ágaskodtak, mint a kontrollok (28.A ábra). Hasonlóképpen a megtett távolság is nagyon alacsony volt 2 hetes életkorban, ekkor azonban a hypoxiás állatok kissé többet mozogtak, és ez a különbség már statisztikailag szignifikáns volt. (28.B ábra). Három hetes életkorra mindkét állatcsoport jelentősen fejlődött, és nem mutatkozott különbség a csoportok között. Ugyanakkor a kontroll egyedek 6 hetes korukig ugyanolyan teljesítményt mutattak, mint amelyet 3 hetesen teljesítenek. Ezzel szemben a hypoxiás egyedek tovább fejlődtek, és 6 hetesen szignifikánsan többet mozogtak, mint azt 3 hetesen tették, és ez szignifikáns a 6 hetes kontrollcsoporthoz képest is (28.B ábra). Ugyanilyen mintázat figyelhető meg a mozgási sebességnél is, a hypoxiás egyedek gyorsabban mozognak 2 és 6 hetes korban, mint a kontrollok, míg 3 hetes korban nem volt különbség (28.C ábra). A fal mellett és sarokban töltött idő szignifikánsan magasabb volt 2 hetes korban a hypoxiás csoportban (28.D ábra). Későbbi életkorokban a kontroll állatok töltöttek több időt a falak mellett és a sarkokban. A hypoxiás állatokban nem változott meg a fal mellett töltött idő mennyisége ahogy idősebbek lettek, míg a sarkokban egyre kevesebb időt töltöttek (28.D ábra). Nem volt különbség a mosakodási magatartással töltött idő arányában és a fekális bólusok számában egyik vizsgált életkorban sem.



28. ábra: Open-field aktivitás kontroll és hypoxiás állatoknál 2, 3 és 6 hetes korban. (A) fejmelgetések és ágaskodások száma; (B) megtett távolság; \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  a kontrollhoz képest.

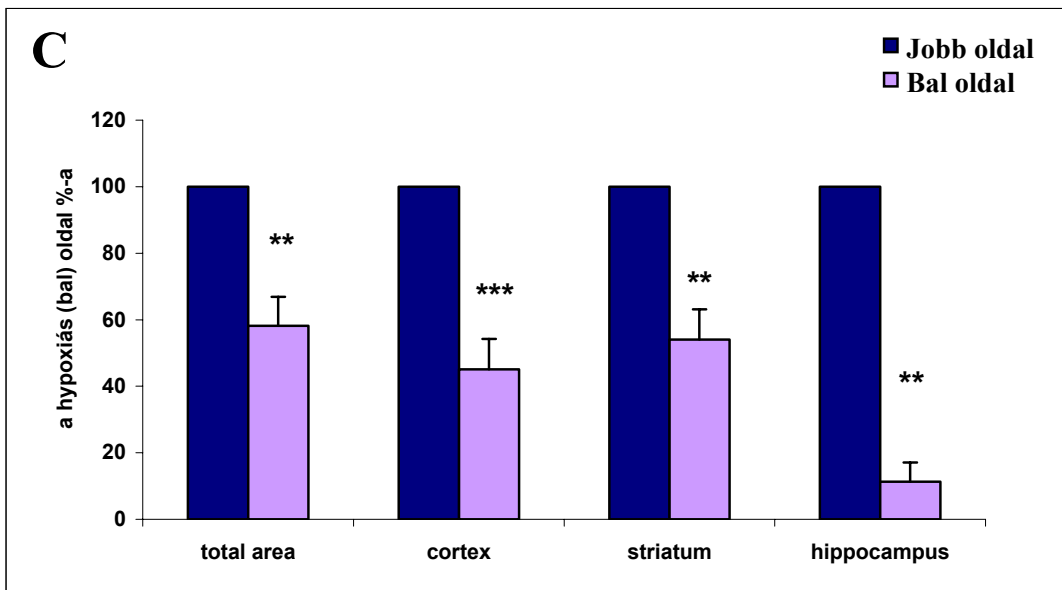
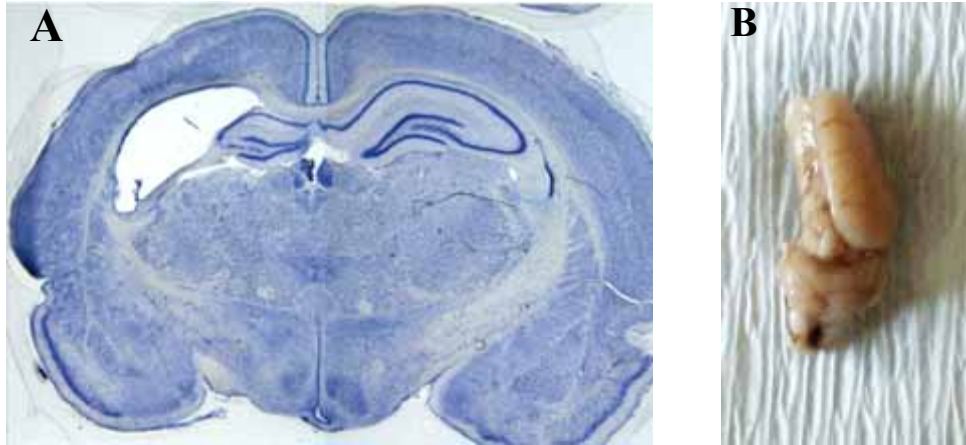


28. ábra: Open-field aktivitás kontroll és hypoxiás állatoknál 2, 3 és 6 hetes korban. (C) mozgási sebesség; (D) fal mellett és sarokban töltött idő mennyisége. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  a kontrollhoz képest.

#### 3.2.4. Szöveti feldolgozás

A kontroll állatok agyféltekéi között nem volt morfológiai különbség. A legtöbb esetben a hypoxia súlyos féltekéi atrophíát okozott (29. ábra). Az ipszilaterális félteke térfogata az ép kontralaterálishoz képest átlagosan 58% volt. A legsúlyosabb károsodás a hippocampusban volt megfigyelhető, aminek mérete csak 11%-a volt a károsodott féltekében az éphez képest. Körülbelül 50%-os redukció volt a cortex és a striatum

térfogatában, ami az oldalkamra következményes megnagyobbodásával járt (29.A ábra), amely  $580 \pm 136\%$ -a volt az ipszilaterális oldalon a kontralaterálishoz képest.



29. ábra: A: Egy reprezentatív szövettani kép Nissl festéssel egy hypoxiás/ischaemiás károsodott agyról. B: Egy extrém mértékben károsodott hypoxiás állat agyának makroszkópos képe. C: Az ipszilaterális félteke mérete az ép kontralaterális félteke méretéhez képest. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  az ép oldalhoz képest.

### 3.3. PACAP és PACAP antagonisták (PACAP 6-38) kezelése

#### 3.3.1. Fizikális jelek és neurológiai reflexek vizsgálata

A PACAP kezelés gyorsította a faciális jelek érését átlagosan 1-1.5 nappal, míg a PACAP 6-38 kezelés késleltette a szemnyitás és a fül kiegyenesedés megjelenését hozzávetőleg 1 nappal a kontroll csoporthoz képest (VI. táblázat).

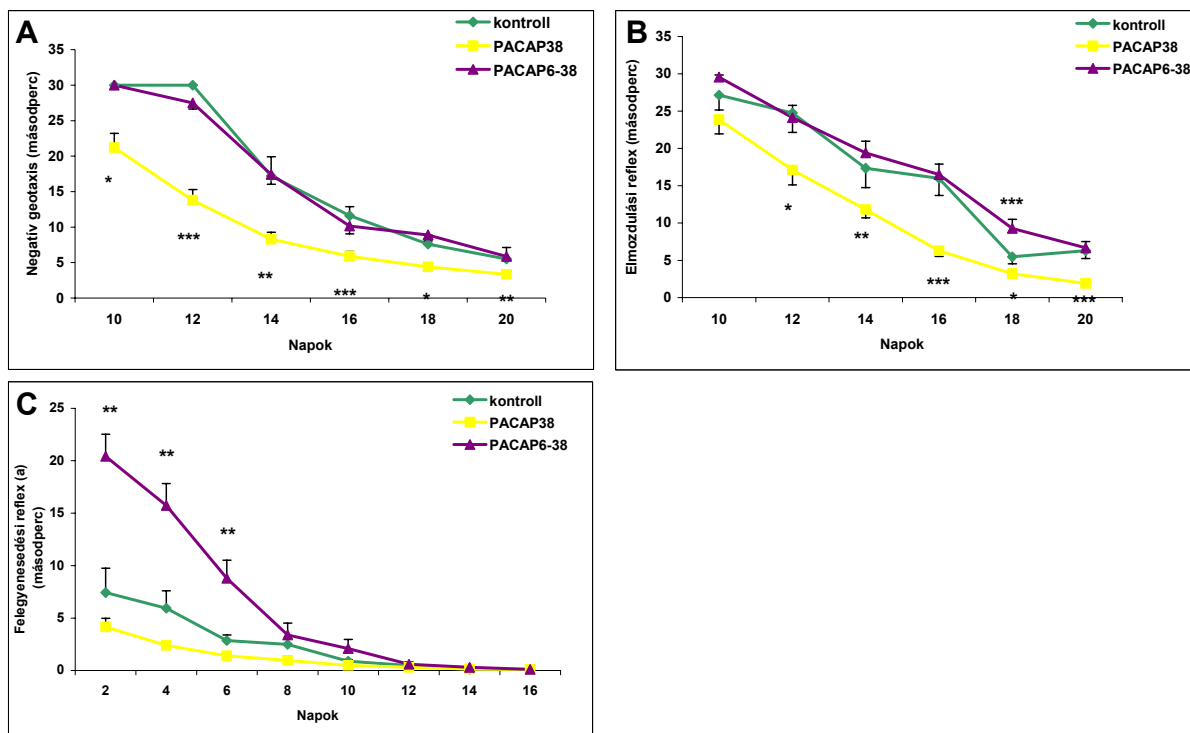
A neurológiai reflexek közül a keresztezett extenzor reflex eltűnése, a felegyenesedési reflex, a hátsó láb ráhelyezési, és mellső láb fogó reflexek megjelenése nem mutatott szignifikáns eltérést a PACAP kezelt és a kontroll csoport között. Minden egyéb jel átlagosan 1.5-2.5 nappal előbb jelentkezett a PACAP kezelés hatására. Az PACAP 6-38 csak a hátsó láb fogó reflex megjelenését késleltette, az a megfigyelési idő végén sem jelentkezett a legtöbb állatnál (VI. Táblázat).

**VI. Táblázat:** A fizikális jelek és neurológiai reflexek megjelenésének napja kontroll, PACAP 38- és PACAP 6-38- kezelt állatokban. Átlag  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  \*\*\*  $P < 0.001$  a kontrollcsoporthoz képest.

<b>Jelek</b>	<b>Kontroll</b>	<b>PACAP38</b>	<b>PACAP6-38</b>
<b>Szemnyitás</b>	15.27 $\pm$ 0.15	13.72 $\pm$ 0.13 ***	16.07 $\pm$ 0.19 ***
<b>Metszőfog kinövés</b>	11.69 $\pm$ 0.36	10.31 $\pm$ 0.17 ***	11.80 $\pm$ 0.19
<b>Fül kiegyenesedés</b>	14.00 $\pm$ 0.00	12.82 $\pm$ 0.12 ***	14.76 $\pm$ 0.21 *
<b>Negatív geotaxis</b>	12.40 $\pm$ 0.12	10.87 $\pm$ 0.33 *	13.24 $\pm$ 0.25
<b>Keresztezett extenzor reflex</b>	7.53 $\pm$ 0.80	7.37 $\pm$ 0.46	8.00 $\pm$ 0.48
<b>Fülrángás reflex</b>	15.53 $\pm$ 0.18	14.00 $\pm$ 0.26 ***	14.92 $\pm$ 0.20
<b>Szemhéj reflex</b>	14.82 $\pm$ 0.21	13.00 $\pm$ 0.20 ***	14.04 $\pm$ 0.12
<b>Mellső végtag ráhelyezés</b>	9.46 $\pm$ 0.52	6.67 $\pm$ 0.68 *	8.92 $\pm$ 0.54
<b>Hátsó végtag ráhelyezés</b>	19.00 $\pm$ 0.52	19.00 $\pm$ 0.59	20.50 $\pm$ 0.24 *

<b>Jelek</b>	<b>Kontroll</b>	<b>PACAP38</b>	<b>PACAP6-38</b>
<b>Melső végtag fogó</b>	9.15±0.50	7.00±0.53	8.68±0.61
<b>Hátsó végtag fogó</b>	15.00±0.30	12.63±0.52 **	14.50±0.40
<b>Elmozdulási reflex</b>	12.92±0.60	11.13±0.37 *	12.76±0.41
<b>Akusztikus reflex</b>	15.85±0.24	13.18±0.18 ***	15.44±0.25
<b>Felegyenesedési reflex</b>	6.85±0.60	6.68±0.37	7.56±0.45

A PACAP kezelés nem csupán a reflexek megjelenésének napját hozta előre, hanem azt is eredményezte, hogy az egyes állatok rövidebb idő alatt teljesítették a kijelölt feladatokat. Minden egyed szignifikánsan javuló teljesítményt nyújtott a neurológiai reflexekben az idő előrehaladtával a kontroll, a PACAP-kezelt és a PACAP 6-38-kezelt csoportokban is. A negatív geotaxisban a PACAP-kezelt állatok a megfigyelési időtartam alatt végig jobban teljesítettek, mint a kontrollcsoport, ugyanakkor a kontroll és a PACAP 6-38-kezelt egyedek teljesítménye közt nem volt szignifikáns eltérés (30.A ábra). Az elmozdulási reflexben a PACAP kezelés 12-20 napos korban mutatott jelentős hatást. Az PACAP 6-38 és a kontroll csoport között csak a 18. napon észleltünk szignifikáns különbséget (30.B ábra). A felegyenesedési reflexben a PACAP antagonistá kezelés hatására az állatok szignifikánsan hosszabb idő alatt fordultak meg, mint a kontrollcsoport egyedei 2-6 napos korban (30.C ábra), míg a PACAP-nak nem volt kimutatható hatása a teljesítési időre. Ugyanakkor a megfigyelési periódus egészét tekintve minden állat fejlődést mutatott ebben a reflexben is.



30. ábra: A: a negatív geotaxis ideje, B: az elmozdulási reflex ideje kontroll, PACAP és PACAP 6-38 kezelt állatokon, C: felegyenesedési reflex ideje kontroll, PACAP és PACAP 6-38 kezelt csoportokban. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  a kontrollhoz képest.

### 3.3.2. Az open-field aktivitás

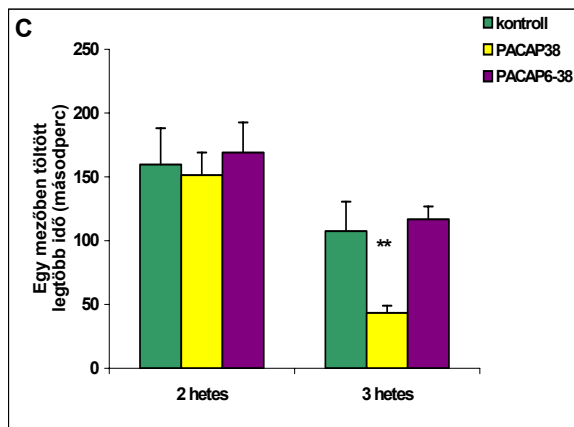
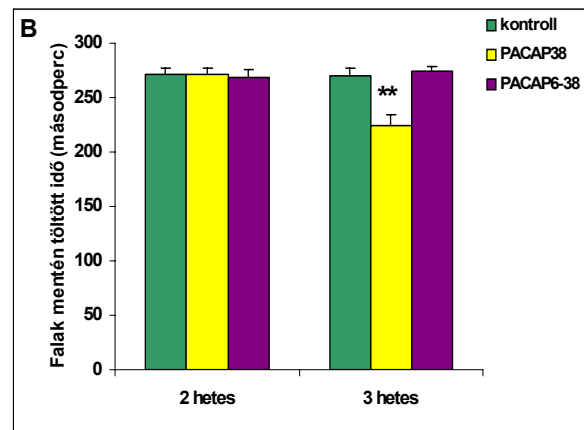
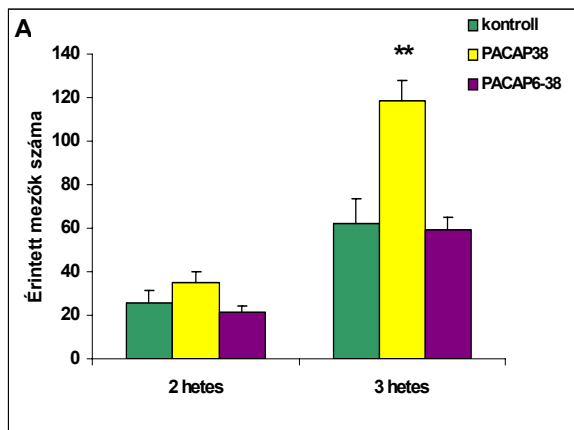
Két hetes korban a jellegzetes mozgási mintázat mindhárom csoportban hasonló volt. A patkányok néhány másodpercig a középpontban mozogtak, majd a fal mellé mentek, ahol idejük legnagyobb részét egy mezőben töltötték. Semmilyen különbséget nem lehetett kimutatni az állat által érintett mezők számában (31.A ábra), vagy a megfigyelési idő második felében érintett mezők számában a három csoport között. A PACAP kezelést kapott egyedek többször emelték a fejüket, és többször ágaskodtak fel, mint a kontrollcsoport, míg a PACAP 6-38 kezelt csoport kevesebbszer, de ez a tendencia nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak (VII. táblázat).



Minden állat szignifikánsan több mezőt érintett három hetes korban az egy héttel azelőttihez képest. Ekkor a PACAP kezelt állatok közel kétszer annyi zónába léptek be, mint a kontroll, vagy a PACAP 6-38 kezelt csoportok (31.A ábra). A megfigyelési idő második felére eső zónaszámban nem volt megfigyelhető eltérés. A fejemelések száma nem nőtt a két hetes korban megfigyelthez képest és a csoportok közt sem volt eltérés. Az ágaskodások száma viszont emelkedett mindegyik csoportban, és szignifikáns eltérés volt kimutatható a kontroll és a PACAP kezelt csoport közt (VII. táblázat). A fekális bólusok számában semmilyen különbséget nem találtunk. Két hetes korban a falak mentén eltöltött idő hosszában nem volt különbség a csoportok között, minden egyed az összidő körülbelül 90%-át töltötte a falak mentén (31.B ábra). Mindazonáltal ez a százalék jelentősen lecsökkent három hetes PACAP-kezelt állatok esetén, mivel idejük mindössze kétharmadát töltötték a falak mellett (31.B ábra). A kontroll illetve PACAP 6-38 kezelt állatok esetén ez a változás elmaradt (31.B ábra). Három hetes korban az PACAP 6-38 és a kontroll patkányok idejük több mint 50%-át két fal találkozásánál a sarokban töltötték, a PACAP kezelt egyedek csupán 25%-át (VII. táblázat). Két hetes korban nem számoltuk ki a sarokban töltött idő arányát, mivel az állatok a fal elérése után megálltak, és ott maradtak a megfigyelési idő végéig, függetlenül attól, hogy a sarokban érték-e el a falat. Hasonlóképpen a két hetes állatok, ha egyszer elérték a falat, többet nem tértek vissza a középső mezőkhöz. Három hetes korban a PACAP 6-38 kezelt, illetve a kontroll csoport egyedei általában egyszer visszatértek a kiindulási helyre, míg a PACAP kezelt legalább kétszer tették meg ugyanezt (VII. táblázat). Végezetül az állatok két hetes korban idejük több mint felét egyetlen zónában töltötték el, a csoportok közt szignifikáns eltérést nem találtunk (29.C ábra). Három hetes korban már szignifikáns különbségek voltak, a PACAP-kezelt csoport egyedei csupán idejük 14%-át töltötték el egy mezőben, míg a kontroll és a PACAP 6-38-kezelt csoportok 35%-át, a két hetes eredményekhez képest szignifikáns eltérést nem mutattak (31.C ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a PACAP kezelés növelte az aktivitást a felfedező magatartás során, különösen három hetes korban, míg a PACAP antagonistá hatása nem volt kifejezett.

**VII. Táblázat:** A PACAP 38 és PACAP 6-38 kezelt állatok open-field tesztben elért teljesítménye. Átlag±SEM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 a kontroll egyedekhez viszonyítva.

A mért paraméterek	Kor	Kontroll	PACAP38	PACAP6-38
Fejemelések száma	2 hét	18.5±3.1	33.6 ± 3.8	9.6±3.1
	3 hét	18.2±2.2	28.0 ± 3.3	12.7±1.2
Ágaskodások száma	2 hét	2.5±1.0	4.7 ± 1.0	0.6±0.2
	3 hét	16.3±4.7	35.9 ± 3.6 **	6.7±0.9
A középponthoz való visszatérések száma	3 hét	0.8±0.3	2.5 ± 0.4 *	0.9±0.3
A sarkokban eltöltött idő (másodperc)	3 hét	150.1±22.6	77.5 ± 9.8 ***	188.8±10.5



31. ábra: (A) Az érintett mezők száma, (B) falak mentén eltöltött idő másodpercekben, (C) az egy mezőben eltöltött leghosszabb idő kontroll, PACAP és PACAP 6-38 kezelt csoportokban. \*\*P<0.01 a kontrollhoz viszonyítva.

### **3.4. Glutamát és PACAP kezelés kombinációja**

Ebben a kísérletben a patkányok a posztnatális 1, 5 és 9. napon 4 mg/testtömeg gramm nátrium glutamátot, és 1-14 napos korban napi 1 µg PACAP 38-at kaptak subcutan injekcióban.

3.4.1. A fizikális jelek és neurológiai reflexek megjelenésének alakulását a VIII. táblázatban foglaltuk össze. A glutamát kezelés a mellső végtagi ráhelyezési és fogó reflexek, valamint a felegyenesedési reflex (magasból leejtés, 2.3.1.b) megjelenését késleltette, míg a PACAP kezelést is kapott állatokban ezek a reflexek korábban jelentek meg, hasonló időpontban, mint a normál állatoknál. A glutamátról ismert, hogy hátráltatja a szomatikus növekedést is, amit a kezelt egyedek csökkent testsúlya is jelez (IX. táblázat). A megfigyelési idő végére a glutamát-kezelt csoport egyedeinek súlya a normál egyedekének körülbelül kétharmada volt. A PACAP-pal is kezelt állatok súlya hozzávetőleg egy grammal volt több a csak glutamáttal kezeltékhez képest a hatodik naptól kezdve a megfigyelési időtartamban, de ez statisztikailag nem volt szignifikáns eltérés. A glutamát-kezelt patkányok rosszabb teljesítményt nyújtottak a felegyenesedési reflexben (megfordulás, 2.3.1.a) és az elmozdulási reflexben, és 2 hetes korban ezt a negatív hatást a PACAP kezelés kivédte (IX. táblázat).

#### 3.4.2. Motoros koordinációs tesztek

A lépéshiba tesztben, amely teszt érzékeny módszere a motoros koordináció fejlődésének vizsgálatára, azt találtuk, hogy a PACAP-pal is kezelt állatok 2 hetes korban szignifikánsan kevesebbet hibáztak, mind a mellső, mind a hátsó végtaggal, mint a glutamát-kezelt csoport (IX. táblázat).

**VIII. táblázat:** A fizikális jelek és neurológiai reflexek megjelenésének napjai kontroll, csak glutamát, valamint glutamát- és PACAP-kezelt patkányokban. Átlag  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  a kontrollhoz képest, # $P < 0.05$  a glutamát-kezelthez képest.

Jelek	Megjelenés napja		
	Kontroll	MSG	MSG+PACAP
Szemnyitás	14.53 $\pm$ 0.18	13.94 $\pm$ 0.17	13.86 $\pm$ 0.20
Metszőfog kinövés	9.84 $\pm$ 0.18	9.64 $\pm$ 0.18	9.78 $\pm$ 0.16
Fül kiegyenesedés	13.23 $\pm$ 0.16	13.35 $\pm$ 0.11	13.21 $\pm$ 0.11
Negatív geotaxis	11.07 $\pm$ 0.32	11.76 $\pm$ 0.34	10.57 $\pm$ 0.28
Fülrángás reflex	15.23 $\pm$ 0.50	15.00 $\pm$ 0.51	14.71 $\pm$ 0.59
Szemhéj reflex	12.92 $\pm$ 0.43	13.11 $\pm$ 0.20	13.21 $\pm$ 0.23
Melső végtag ráhelyezés	10.46 $\pm$ 0.46	12.17 $\pm$ 0.32 **	11.93 $\pm$ 0.26 *#
Hátsó végtag ráhelyezés	20.15 $\pm$ 0.31	20.64 $\pm$ 0.20	20.00 $\pm$ 0.31
Melső végtag fogó	6.15 $\pm$ 0.31	7.05 $\pm$ 0.32 *	6.07 $\pm$ 0.23 #
Hátsó végtag fogó	8.31 $\pm$ 0.26	8.76 $\pm$ 0.32	8.35 $\pm$ 0.19
Elmozdulási reflex	10.15 $\pm$ 0.63	10.12 $\pm$ 0.50	9.35 $\pm$ 0.28
Akusztikus reflex	13.61 $\pm$ 0.21	13.94 $\pm$ 0.30	13.71 $\pm$ 0.19
Felegyenesedési reflex (b)	4.76 $\pm$ 0.30	6.35 $\pm$ 0.41 **	5.71 $\pm$ 0.19 #

**IX. táblázat:** Testsúly alakulása, reflexteljesítmények és lépéshiba teszteljesítmény 2 és 3 hetes kontroll, glutamát-kezelt valamint glutamát- és PACAP-kezelt patkányokban. Átlag  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  a kontrollhoz képest.

	<b>Kontroll</b>	<b>MSG</b>	<b>MSG+PACAP</b>
<b>Testsúly (gr)</b> <b>2 hetes</b>	22.77 $\pm$ 0.83	16.97 $\pm$ 0.64***	17.54 $\pm$ 0.42***
<b>3 hetes</b>	33.65 $\pm$ 1.47	24.26 $\pm$ 0.90***	25.19 $\pm$ 0.66***
<b>Felegyenesedés (a) (másodperc)</b> <b>2 hetes</b>	0.61 $\pm$ 0.02	1.32 $\pm$ 0.14*	0.75 $\pm$ 0.07
<b>3 hetes</b>	0.10 $\pm$ 0.00	0.15 $\pm$ 0.03	0.13 $\pm$ 0.01
<b>Geotaxis (másodperc)</b> <b>2 hetes</b>	21.96 $\pm$ 1.6	22.03 $\pm$ 1.94	19.70 $\pm$ 1.77
<b>3 hetes</b>	6.76 $\pm$ 1.20	7.98 $\pm$ 1.17	10.58 $\pm$ 1.68
<b>Elmozdulási reflex (másodperc)</b> <b>2 hetes</b>	13.84 $\pm$ 2.58	16.64 $\pm$ 2.10*	15.85 $\pm$ 1.74
<b>3 hetes</b>	5.20 $\pm$ 1.40	7.69 $\pm$ 1.10	6.17 $\pm$ 1.16
<b>Lépéshibasám</b> <b>2 hetes</b>	8.4 $\pm$ 1.0	11.3 $\pm$ 1.9**	8.1 $\pm$ 1.7
<b>3 hetes</b>	3.5 $\pm$ 0.3	6.5 $\pm$ 1.0*	6.1 $\pm$ 0.9*

### 3.4.3. Szövettan

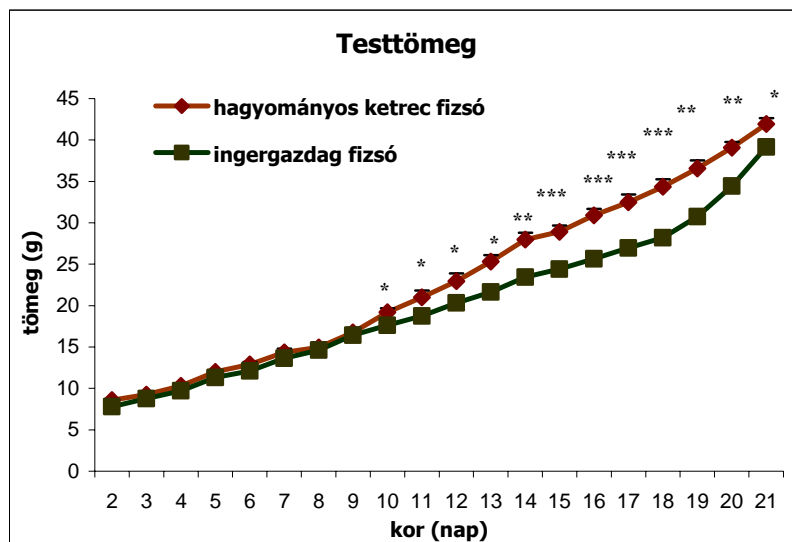
A nucleus arcuatus szövettani vizsgálata azt mutatta, hogy a glutamát kezelés hatására jelentősen lecsökken a tyrosin-hydroxilase pozitív sejtek száma: a kezelt egyedek esetén 12.7 $\pm$ 0.1%-ra ( $P < 0.001$ ) a normál egyedekéhez (100%) képest.

A PACAP-al is kezelt csoportban a sejtszám magasabb, a normál sejtszám 35.2 $\pm$ 8.8%-a ( $P < 0.01$  a kontrollhoz képest), de ez a glutamát-kezelt csoporthoz képest nem szignifikáns eltérés.

### 3.5. Ingergazdag környezet

#### 3.5.1. Fizikális jelek és neurológiai reflexek

A 10. naptól kezdve az ingergazdag környezetben tartott állatok testsúlya szignifikánsan alacsonyabb, mint a hagyományos ketrecben tartott “ingerszegény” egyedek tömege (32. ábra).



32. ábra: Testsúly alakulása hagyományos és ingergazdag környezetben tartott állatcsoportokban. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  az ingergazdaghoz képest.

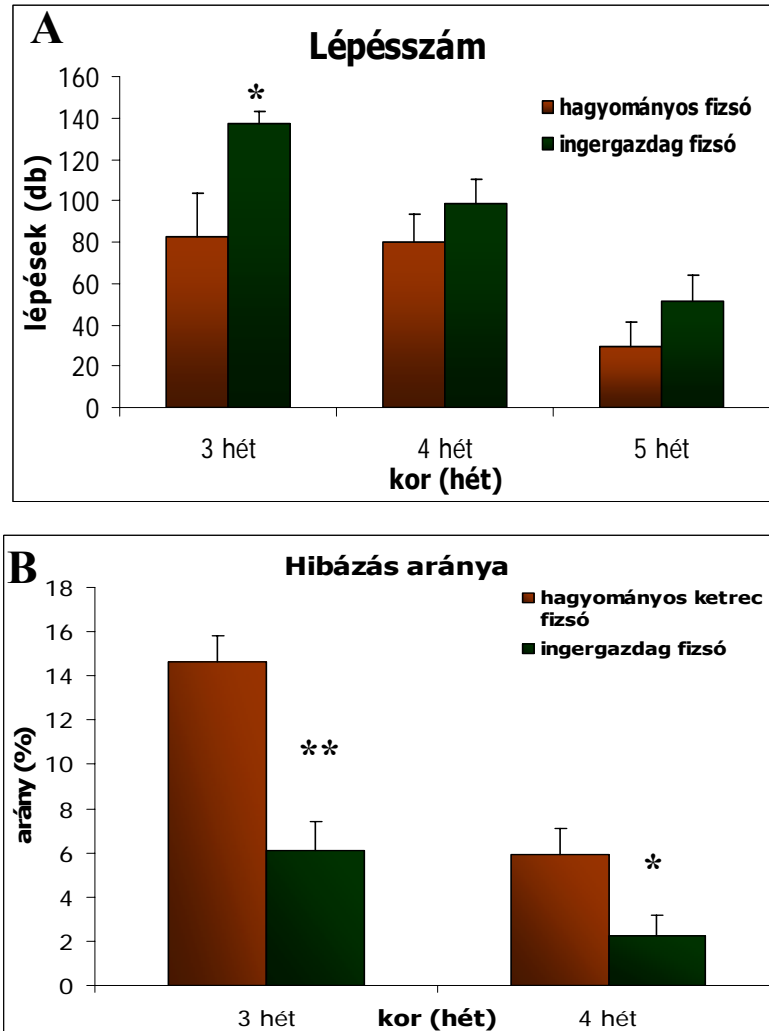
Egyéb fizikális paraméterben nem volt eltérés, így a szemnyitás, metszőfog kinövés és fül kiegyenesedés esetén sem.

A neurológiai reflexek megjelenését gyorsította az ingergazdag környezet, és a reflexekben nyújtott teljesítmény is javuló tendenciát mutatott, azonban az eltérések többségében nem voltak szignifikánsak a három állatcsoport között (adatok nincsenek ábrázolva).

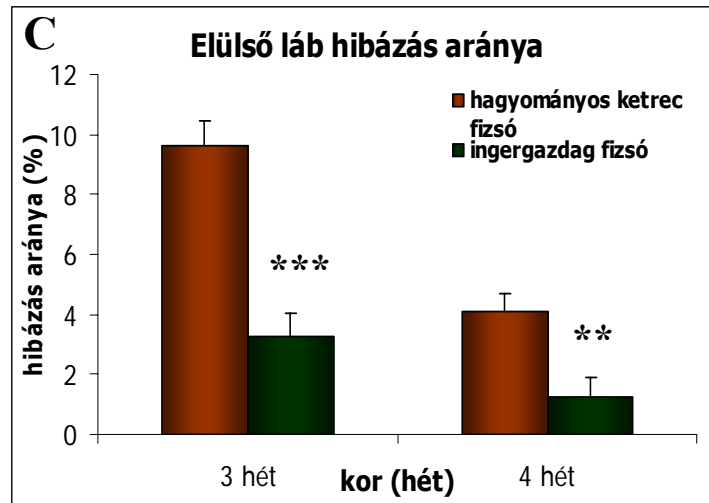
#### 3.5.2. Motoros koordinációs tesztek

A motoros koordinációs tesztek közül egyedül a lépésszám és lépéshiba tesztben volt jelentős eltérés a hagyományos és az ingergazdag állatcsoport között. Az ingergazdag egyedek három hetes korban szignifikánsan többet mozognak a rácson, és ezzel

egyidőben arányaiban kevesebbet hibáznak elsősorban mellső lábbal (33.A, 33.B és 33.C ábra).



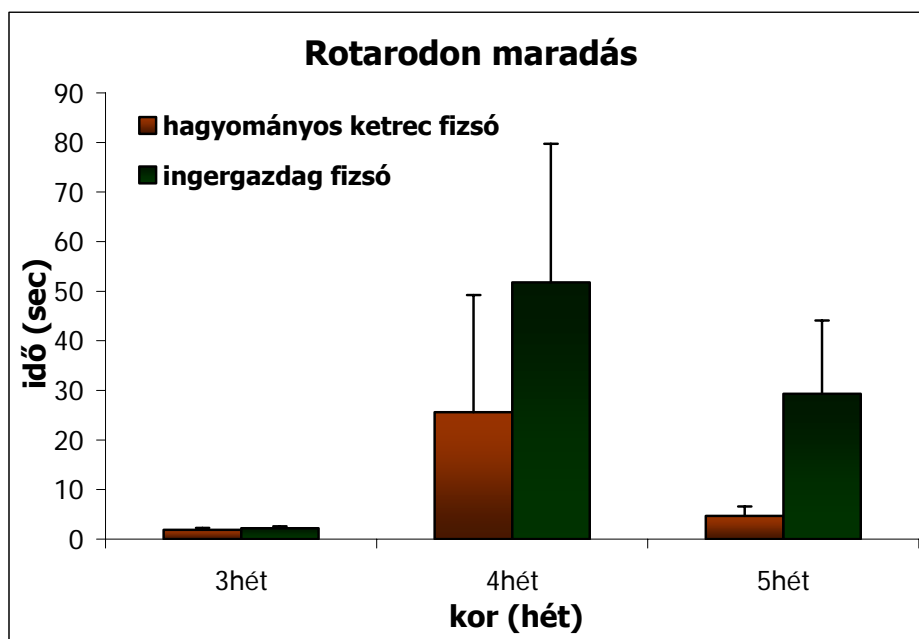
33. ábra: A: összlépésszám, B: lépéshibaszám mindkét végtaggal a hagyományos és ingergazdag ketrecben tartott állatoknál. A lépéshibák az összlépésszám arányában százalékosan megadva. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  a hagyományos ketrechez képest.



33. ábra: C: lépéshibaszám mellső végtaggal a hagyományos és ingergazdag ketrechen tartott állatoknál. A lépéshibák az összlépésszám arányában százalékosan megadva. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  a hagyományos ketrechez képest.

Az ingergazdag környezetben nevelt állatok jobban teljesítettek a mozgás iniciációs tesztben elsősorban 3 hetes korban, de ez az eltérés nem volt szignifikáns. A rota-rod (mókuserék) tesztben 3 hetes korban egyik csoport egyedei sem tudtak még rövidebb időt sem a keréken tölteni. 4 és 5 hetesen viszont az ingergazdag csoport egyedei átlagban tovább tudtak a keréken maradni, mint a hagyományos ketrechen tartott csoport állatai (34. ábra). Ezek az eltérések 5 hetesen kifejezettebbek, de még ott sem szignifikáns.

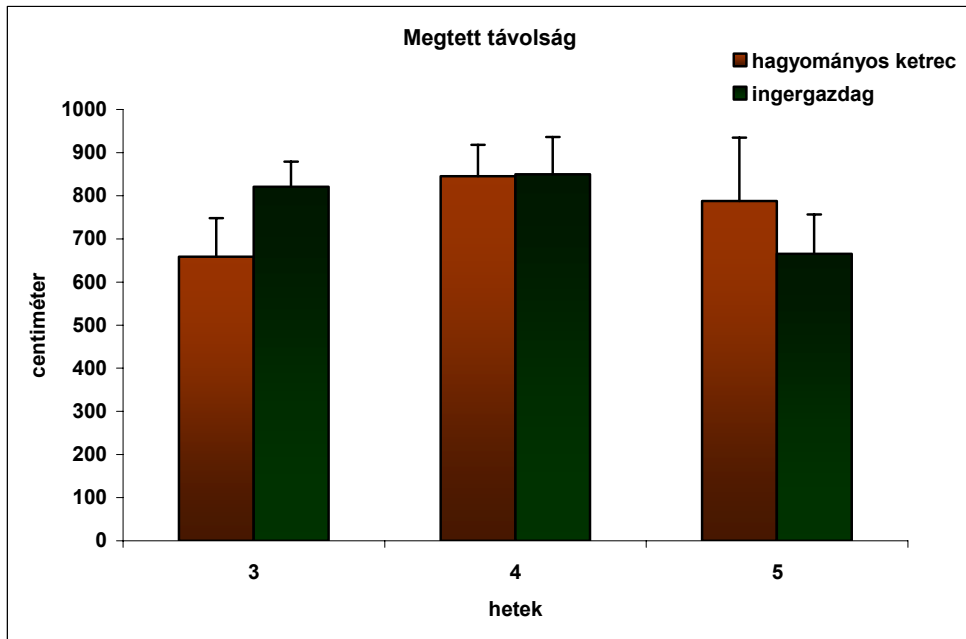




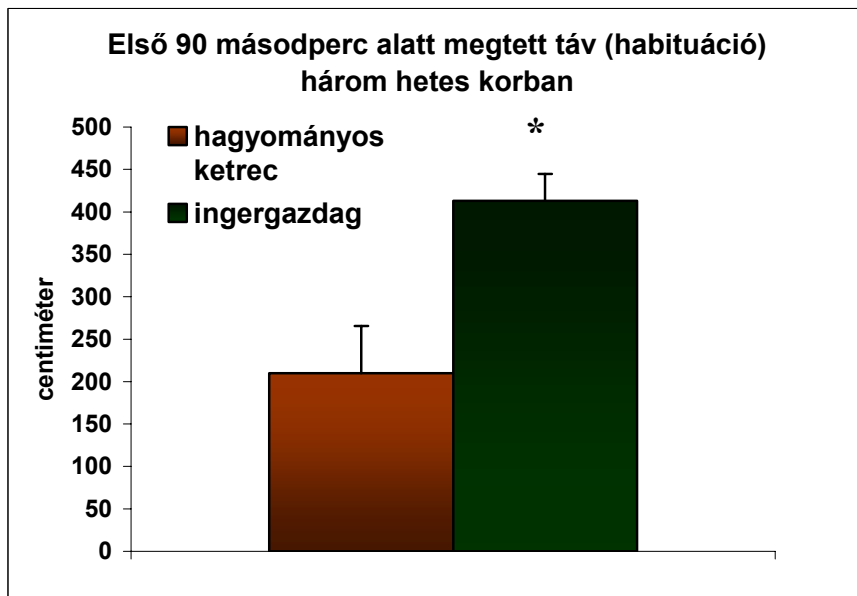
34. ábra: Rota-rod (mókuskerék teszt) hagyományos ketreces és ingergazdag ketrecben tartott állatoknál.

### 3.5.3. Open-field teszt

Az open-field teszt során összességében a mozgásmennyiségben nem volt jelentős eltérés a két állatcsoport között. 3 hetes életkorban az ingergazdag állatok többet mozogtak (35. ábra), de ez nem volt szignifikáns. A mozgási sebességben nem volt eltérés, a mozgásmennyiség különbözősége abból adódott, hogy az ingergazdag állatok szignifikánsan többet mozogtak a megfigyelési idő első 90 másodpercében (36. ábra).



35. ábra: Megtett távolság centiméterben hagyományos és ingergazdag csoportokban.

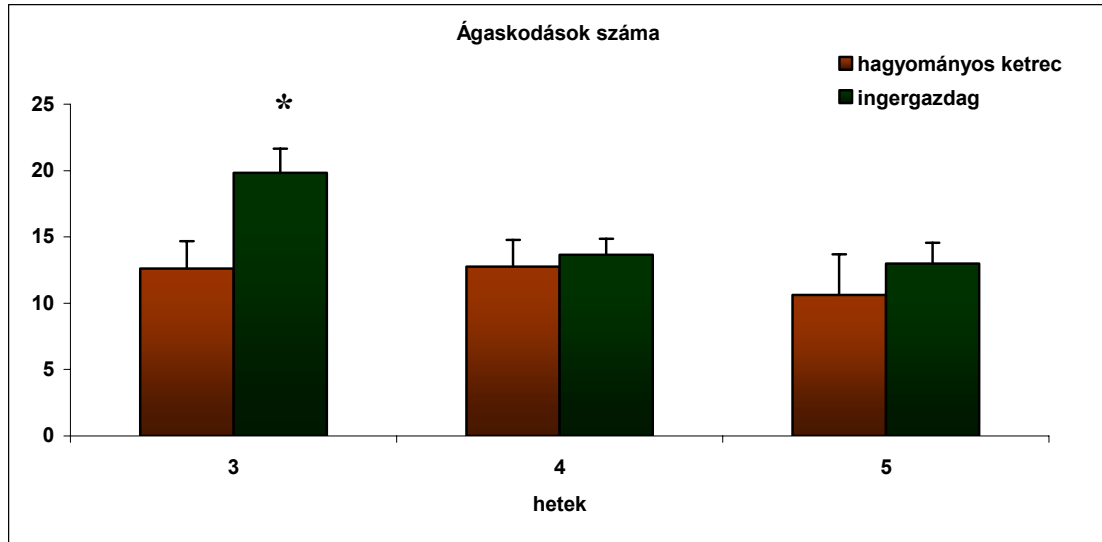


36. ábra: Habitúció három hetes korban (a megfigyelési idő első 90 másodpercében megtett távolság) hagyományos ketrecben tartott és ingergazdag állatoknál.

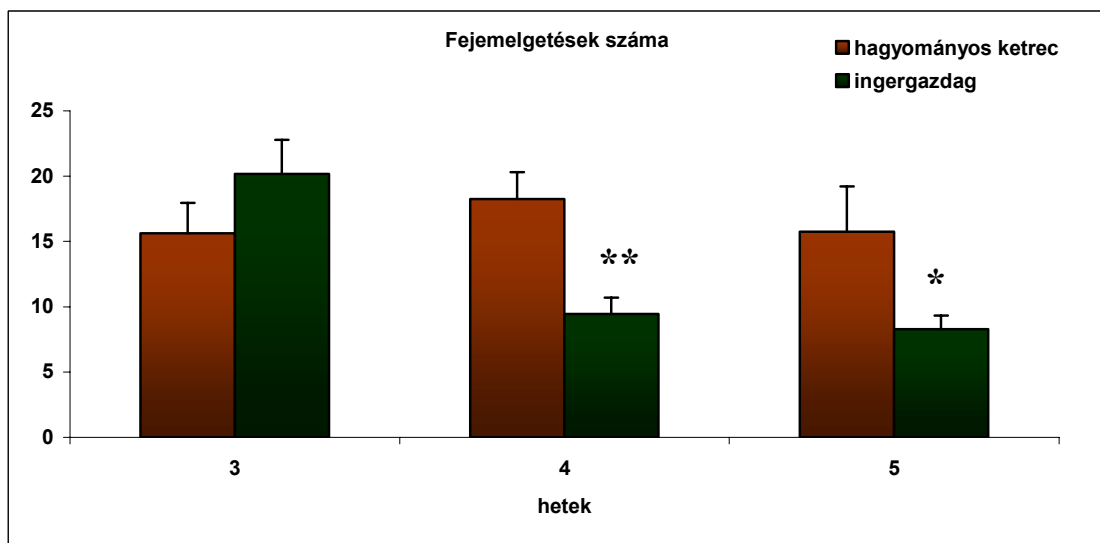
\* $P < 0.05$  a hagyományos ketrechez képest

Három hetes korban az ingergazdag egyedek szignifikánsan többet ágaskodtak, mint a hagyományos ketrecben nevelt állatok (37. ábra), a többi megfigyelt időpontban nem volt eltérés. Négy és öt hetes életkorban pedig a fejemelgetések számában volt eltérés, a

hagyományos ketrecben tartott csoport egyedei szignifikánsan többet emelgették fejüket, mint az ingergazdag csoport (38. ábra).



37. ábra: Ágaskodások száma a megfigyelési idő során. \* $P < 0.05$  a hagyományos ketrechez képest.



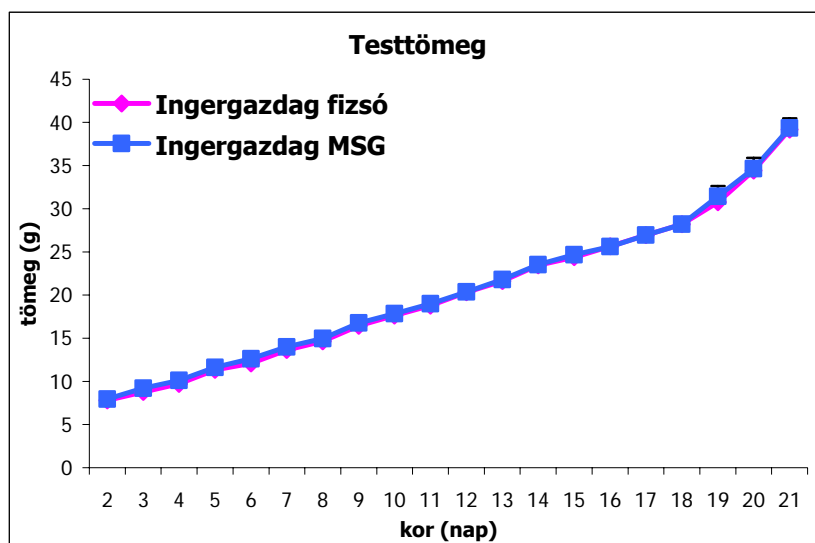
38. ábra: Fejemelgetések száma az open-fildben. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  a hagyományos ketrechez képest.

### 3.6. Ingergazdag környezet hatása nátrium-glutamát indukálta toxikus lézióban

Mindkét csoportban az egyedek egy részének alacsony dózisu (2mg/testtömeg gramm) nátrium-glutamátot adtunk subcutan injekciós formában a posztnatális 1, 5. és 9. napon. A kezelés sikerességét itt is szövettani vizsgálattal igazoltuk.

#### 3.6.1. Fizikális jegyek és neurológiai reflexek

Ahogy az a 3.1. fejezetben szerepel, a glutamát kezelés nagymértékben hátráltatja a szomatikus fejlődést, a kezelt állatok alacsonyabb súlyúak, mint a kontroll (fiziológias sóval kezelt) egyedek. Ez a különbség eltűnt az ingergazdag környezetben, a glutamát-kezelt és kontroll egyedek súlya megegyezik a megfigyelési idő során (39. ábra).



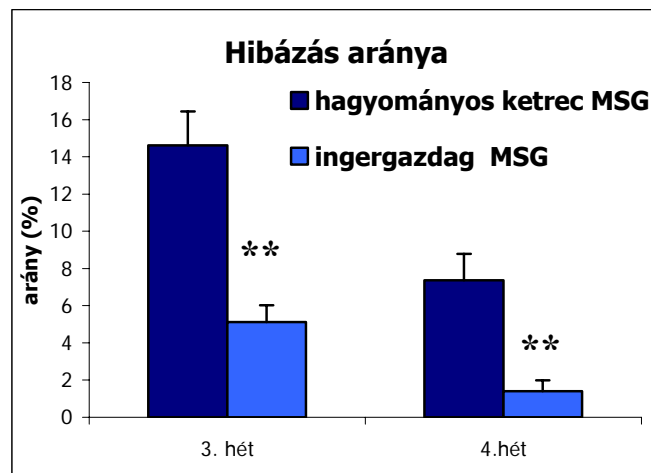
39. ábra: Ingergazdag ketrecben nevelt kontroll és glutamát-kezelt állatok súlyának alakulása a megfigyelési időszak alatt.

Az egyéb fizikális jegyek megjelenését nem befolyásolta a glutamát kezelés. A neurológiai reflexek megjelenése és az azokban nyújtott teljesítmény az ingergazdag környezetben tartott glutamát-kezelt állatoknál jobb volt, mint a hagyományos ketrecben tartott glutamát-kezelt állatoké, de ez a javulás nem szignifikáns. Ugyanakkor ebben a

kísérletben az alkalmazott alacsony dózisú nátrium-glutamát kezelés nem okozott olyan mértékű károsodást, mint ahogy az a 3.1. fejezetben szerepel, és az ingerszegény, hagyományos környezetben tartott kontroll és glutamát-kezelt egyedek között is csak enyhe, nem szignifikáns eltérések mutatkoztak.

### 3.6.2. Motoros koordinációs tesztek:

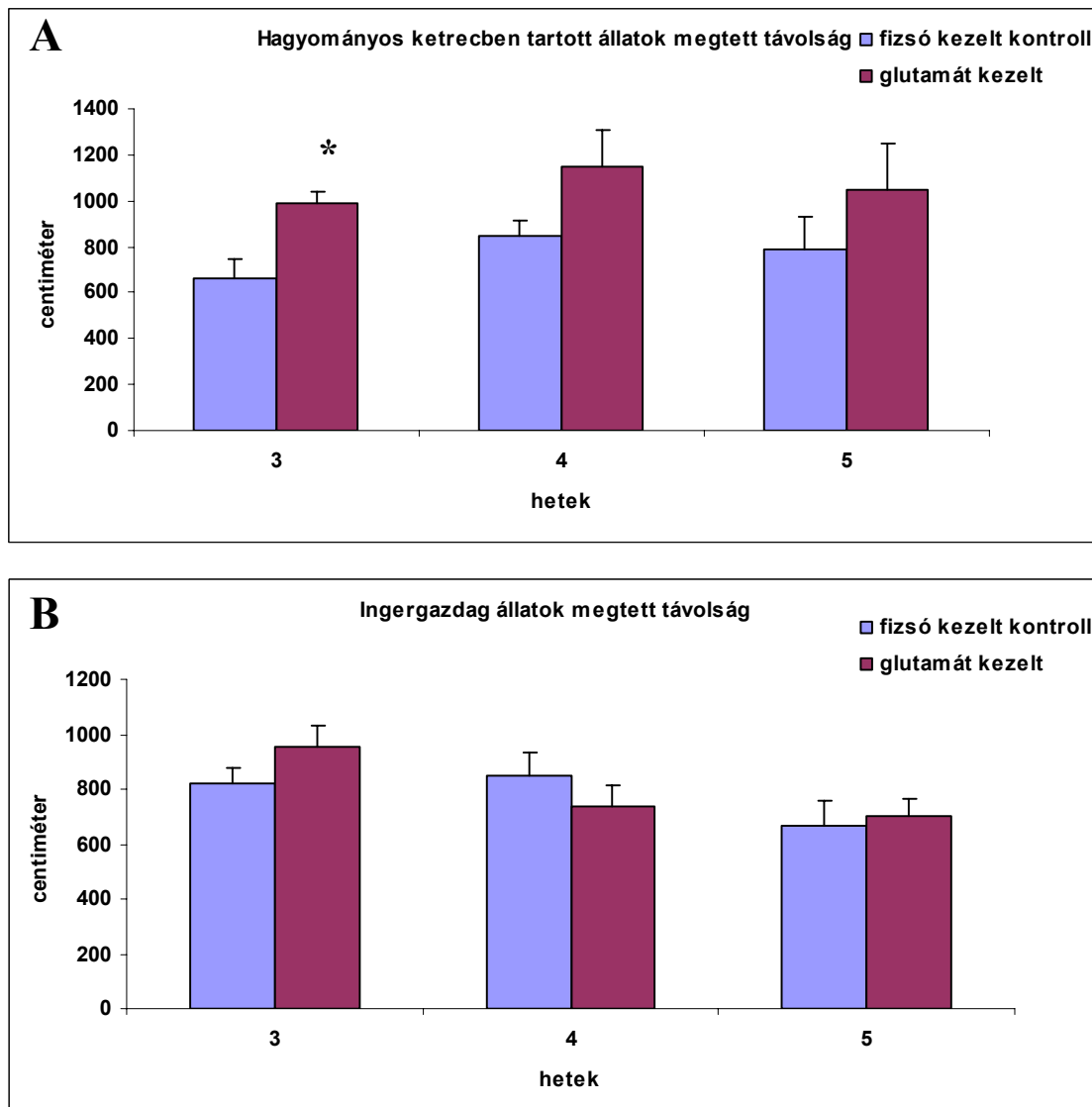
A lépéshiba tesztben a hagyományos ketrecben tartott glutamát-kezelt egyedek rosszabb teljesítményt nyújtanak a kontrolloknál. Az ingergazdag környezet teljes mértékben kivédte ezt a károsító hatást, ugyanis az ingergazdag környezetben tartott glutamát-kezelt egyedek szignifikánsan kevesebbet hibáztak a teszt során, teljesítményük az ingergazdag környezetben tartott (fiziológiás sóoldattal kezelt) kontroll egyedekéhez hasonló volt (40. ábra).



40. ábra: Hagyományos ketrecben és ingergazdag ketrecben tartott nátrium-glutamát kezelt patkányok lépéshibáinak százalékos aránya. **\*\*** $P < 0.01$  a hagyományos ketrecben tartott glutamát kezelthez képest.

### 3.6.3. Open-field teszt

A nátrium-glutamát kezelés az open-field tesztben hyperaktivitást okoz fiatal korban, ami a szignifikánsan nagyobb megtett távolságban és a nagyobb mozgási sebességben nyilvánult meg. Ez a különbség eltűnt ingergazdag környezetben tartott állatok esetén (41. A és 41. B ábra).



41. ábra: Open-field tesztben megtett távolság, A: hagyományos ketrecekben tartott kontroll és glutamát-kezelt, B: ingergazdag környezetben tartott kontroll és glutamát-kezelt állatokban. \* $P < 0.05$  a kontroll állatokhoz képest.

## 4. Megbeszélés

### 4.1. Nátrium-glutamát kezelés

A szomatikus jelek vizsgálata során megfigyeltük a növekedés visszamaradását számos korábbi leírásnak megfelelően (Klingberg et al., 1987; Squibb et al., 1981; Stricker-Krongrad et al., 1998), mely mind a testsúly, mind a testhossz tekintetében megfigyelhető volt. Megjegyzendő ugyanakkor, hogy egyes szerzők nem találtak eltérést ebben a vonatkozásban (Ishikawa et al., 1997). A glutamát kezelés magasabb perinatális mortalitáshoz vezetett.

Kísérleteink során azt találtuk, hogy a neurológiai tesztekben számos esetben késleltetett fejlődési ütemet mutattak a kezelt egyedek a vizsgálatok egy részében, míg más tesztekben nyújtott teljesítményt nem befolyásolt a kezelés. Noha csak kevés korábbi irodalmi adat van a glutamát kezelés hatásairól ezekre a reflexteljesítményekre, van adat arra vonatkozóan, hogy egyes aktivitási paramétereket nem befolyásol a glutamát (Dunn és Webster, 1985; Ishikawa et al., 1997; Iwata et al., 1979; Sanchis-Segura és Aragon, 2002). Iwata et al. (1979) nem találtak eltérést a cornea reflexben és a megdöntött deszkán való kapaszkodási tesztben, ami összhangban van a mi eredményeinkkel. Hasonlóképpen Squibb et al. (1981) nem találtak eltérést az akusztikus reflex esetén kontroll és glutamát kezelt patkányok között. Mi nem mértük az akusztikus reflex teljesítésének idejét, csak a reflex megjelenésének napját vizsgáltuk, de nem találtunk eltérést ebben glutamát kezelést követően.

A motoros koordinációs tesztekben a különböző szerzők egymásnak ellentmondó adatokat közöltek. Egyesek hypoaktivitást (Iwata et al., 1979; Pizzi és Barnhart, 1976; Poon és Cameron, 1978; Seress, 1982; Hlinak et al., 2005), mások hyperaktivitást (Araujo és Mayer, 1973; Dubovicky et al., 1997; Katz, 1983; Klingberg et al., 1987; Saari et al., 1990) írtak le, megint más szerzők pedig nem találtak eltéréseket (Ishikawa et al., 1997; Klingberg et al., 1987; Sanchis-Segura és Aragon, 2002). Azt is leírták, hogy a glutamát-kezelt patkányok spontán aktivitása nem különbözik a kontrolloktól, de az apomorphin- és etanol-provokálta motoros aktivitás csökkent glutamát kezelés hatására

(Ali et al., 2000; Sanchis-Segura és Aragon, 2002). Korábban már számos szerző rámutatott, hogy a glutamát hatásainak ilyen mértékű különbözősége abból adódhat, hogy az eltérő kezelési paradigmák, a különféle tesztelésre alkalmazott eszközök, az állatok kora és a megfigyelési idő hossza nem elhanyagolható módon befolyásolják a kezelés hatásait (Iwata et al., 1979; Miyabo et al., 1985; Klingberg et al., 1987; Hlinak et al., 2005).

Hasonlóképpen az állatok fogóerejéről is ellentmondásos irodalmi adatok állnak rendelkezésre, mind csökkent, mind emelkedett, mind pedig változatlan szorítóerőt leírtak már különböző kísérletekben (Fisher et al., 1991; Iwata et al., 1979; Squibb et al., 1981). A mi kísérleteinkben nem találtunk eltérést a kötélén függeszkedési tesztben erre a paraméterre vonatkozóan. Legkifejezettebb eltéréseket munkacsoportunk a mókuserék és a lépéshiba tesztben talált. Az irodalomban már leírták, hogy glutamát kezelés után a patkányok a mókuserék tesztben rosszabbul teljesítenek, mint a kezeletlen patkányok (Iwata et al., 1979). A lépéshiba számolás tesztet elsősorban féloldali léziók után oldalkülönbségek kimutatására használják (Markgraf et al., 1992; Rogers et al., 1997). Mi azonban azt találtuk, hogy oldaliságbeli különbségek nélkül is jó jelzője a lépéshiba teszt a mozgáskoordináció fejlődésének és az abban bekövetkező zavarok vizsgálatára, hiszen a glutamát kezelt egyedek szignifikánsan rosszabb teljesítményt nyújtottak ezen tesztekben.

Az open-field tesztben a glutamát kezelés hatásaként átmeneti hyperaktivitást találtunk a korai posztnatális időszakban, amit egy enyhe fokú hypoaktivitás váltott fel 8 hetes életkorban. A glutamát kezelés emellett csökkentette a thigmotaxis mértékét 3 hetes kortól. Ez a megfigyelésünk megegyezik a korábbi eredményekkel, ahol hasonlóképpen 2-3 hetes korban hyperaktivitást, majd ezt követő periódusban csak enyhe, vagy semmilyen eltérés nem mutatható ki kontroll és glutamát kezelt patkányok között későbbi életkorokban (Squibb et al., 1981; Klingberg et al., 1987). Az általunk megfigyelt hypoaktivitás enyhe mértékű, csak a mozgás során érintett terület nagyságában nyilvánul meg, egyik másik vizsgált paraméterben sem volt szignifikáns eltérés. Ali et al. (2000) is hasonló következtetésre jutottak, a lokomotoros aktivitásban nem találtak szignifikáns eltérést 2 hónapos patkányokban glutamát kezelést követően. Annak ellenére hogy jelen munkánk nem oldja fel az irodalomban korábban leírt eltérések közötti diszkrpanciát,



adataink azt támasztják alá, hogy a glutamát kezelés átmeneti változásokat okoz a lokomotoros viselkedésben, mely kifejezettebb a korai posztnatális életkorban, majd egy enyhe fokú hypoaktivitás marad vissza, amely mások megfigyelései szerint a felnőttkorban is megmarad (Hlinak et al., 2005).

A glutamát-kezelt állatoknál jelentősen megváltozott az újdonságkereső viselkedés is. Az explorációs magatartás vizsgálatakor a glutamát kezelésben részesült állatok minden tesztelt paraméter esetén eltérő magatartási mintát mutattak. A kontroll állatok egyértelműen jobban érdeklődtek az ismeretlen tárgy iránt az utolsó kísérleti elrendezésben, ugyanis több időt töltöttek mozgással, a habituációjuk lecsökkent, nagyobb területet jártak be, kevesebbet mosakodtak és hosszabb időt töltöttek az új tárgy közelében. Ez megfelel az irodalomban korábban leírt viselkedésnek (Heyser et al., 2004; Hlinak et al., 2005). A glutamát-kezelt állatok ezzel szemben kevésbé voltak aktívak, több időt töltöttek tisztálkodással és szignifikánsan kevesebbet tartózkodtak az ismeretlen tárgy közelében a 4. próbában. Számos gyógyszer és toxikus anyag perinatális adagolását követően leírták, hogy hatásukra megváltozik a patkányok újdonságkereső magatartása (Ledig et al. 1998; Adriani et al. 2003; Heyser et al., 2004). A glutamát hatásairól keveset tudunk a felfedező magatartás vonatkozásában. Korábbi közleményekben leírták, hogy az open-field teszt során, mely szintén újdonságkeresésként értékelhető, nem változott meg a glutamáttal kezelt állatok tisztálkodó magatartása (Dunn és Webster 1985). Ehhez hasonlóan az open-field tesztben mi sem találtunk különbséget a kontroll és a glutamáttal kezelt állatok között tisztálkodás tekintetében. Ezzel szemben, amikor tárgyakat helyeztünk a kísérleti dobozba, szignifikáns különbségeket figyeltünk meg a mosakodási idő értékelésekor. Neonatális glutamát kezelést követően az egymás után következő, azonos open-field tesztekben a felnőtt patkányok csökkenő habituációt mutattak (Dubovicky et al. 1997; Hlinak et al. 2005). A mi eredményeink is megfelelnek ennek, ugyanis a glutamát kezelt állatokat változatlan környezetbe helyezve (2. és 3. próba) habituációjuk csökkent. Azonban egyértelmű különbség van újdonságkereső magatartás tekintetében a glutamát- kezelt és a kontroll állatok között, ha ismeretlen tárggyal bővítjük a kísérleti elrendezést. A kontroll egyedek élénken érdeklődnek a korábban ismeretlen tárgy iránt, míg a glutamát kezelt egyedek elkerülik azt, inkább a számukra már ismert tárgy közelében tartózkodnak.

A glutamát a neurológiai reflexek megjelenését hátráltató, és a motoros koordináció, valamint reflexteljesítmény fejlődésének átmeneti zavarát okozó hatásai valószínűleg a glutamát direkt és indirekt toxikus hatásainak következményei. Számos közlemény bizonyította a táplálkozás és tápláltsági állapot hatásait az idegrendszeri fejlődésre, alultáplált kispatkányok reflexeinek megjelenése késik a normál állatokhoz képest (Smart és Dobbing, 1971). Több szerző is rámutatott, hogy igen nehéz értékelni olyan neurotoxikus anyagok fejlődésre kifejtett hatását, amelyek súlycsökkenést is előidéznek (Bowers et al., 2004; Harry, 1998). A mi eredményeink is azt mutatják, hogy a glutamát kezelt állatok kisebb súlyúak, mint a kontrollok a megfigyelési időtartam folyamán, így ez is hozzájárulhat a glutamát neurotoxikus hatásaihoz. Ugyanígy, az ismert direkt toxikus hatások, melyek a fejlődő agyat az érzékeny periódusban érik, is okozhatják a fent leírt eltéréseket. A posztnatális fejlődés kritikus szakasza patkányban az első három hét, amikor is a szinaptikus kapcsolatok fejlődése, a kortikális és gerincvelői reflexmechanizmusok végső érése zajlik (Markus és Petit, 1987). Bizonyított a közvetlen összefüggés a ráhelyezési reflexek és a piramispálya axonjainak fejlődése között (Donatelle, 1977). Ebben az érzékeny periódusban számos toxikus anyag okoz motoros és reflexteljesítménybeli deficiteket (Bowers et al., 2004; Dam et al., 2000; Harry, 1998). A glutamát kezelés hatásosságát a nucleus arcuatus szövettani vizsgálatával igazoltuk, amely hasonlóan mások eredményeihez nátrium-glutamát kezelést követően neuronális degenerációt és a TH-immunpozitivitás csökkenést mutatott (Seress, 1982). A glutamát kezelés hatására bekövetkező leglátványosabb eltérés a nucleus arcuatus és a retina területén megfigyelhető neuronpusztulás. Ezen kívül a neonatális glutamát kezelés a hippocampus CA1 régiójában is neuronvesztést és morfológiai eltéréseket okoz (Kubo et al., 1993; Ishikawa et al., 1997; Beas-Zarate et al., 2002), a subfornicalis szerv tömege csökken (Pesini et al., 2004) és neuronvesztés figyelhető meg a kéregben (Gonzalez-Burgos et al., 2001; Chaparro-Huerta et al., 2002). A lokomotoros aktivitásról ismert, hogy emelkedik amikor az állatokat számukra addig ismeretlen környezetbe helyezzük. Ez a magatartásváltozás szorosan kapcsolódik a hippocampushoz (Hlinak et al., 2005). Így az általunk megfigyelt változások az újdonságkereső magatartásban glutamát kezelt patkányokban is valószínűleg a hippocampus szerkezeti és neurokémiai változásaival magyarázhatók. Hasonlóképpen, szoros kapcsolat van a mesolimbikus dopaminerg

rendszer, az újdonságkereső magatartás és a nucleus arcuatus között (Miquel et al., 2003; Bardo és Dwoskin, 2004; Schmidt és Beninger, 2006). A neonatális korban adott glutamát több szinten interferál a dopaminerg rendszerekkel (Bodnar et al., 2001; Dawson, 1986; Lin és Pan, 1999; Nakagawa et al., 2000; Wallace és Dawson, 1990; Zelena et al., 1998). Feltételezhető tehát, hogy a nucleus arcuatus pusztulása és a dopaminerg rendszer egyéb elváltozásai okozhatják a tapasztalt viselkedésbeli eltéréseket.

Irodalmi adatok szerint a nátrium-glutamát számos hatása nemtől függ, míg más hatások attól függetlenek, és nem mutatnak szexuális dimorfizmust (Dubovicky et al., 1997; Frieder és Grimm, 1987; Iwata et al., 1979; Squibb et al., 1981). Jelen kísérleteinkben semmilyen nemi eltérést nem tapasztaltunk egyik vizsgált paraméterben sem hím és nőstény egyedek közt, mely összhangban áll a reflexfejlődés és a motoros aktivitás fejlődését leíró korábbi irodalmi adatokkal (Klingberg et al., 1987; Le Roy et al., 1999).

Jelen munkánkban kimutattuk, hogy a posztnatálisan alkalmazott glutamát kezelés hatására a patkányok neurológiai reflexeinek és motoros koordinációjának fejlődése késleltetett ütemű, de 5 hetes korra fejlettségük eléri a normál szintet. Ismert, hogy a glutamát kezelésnek maradandó hatásai is vannak, melyek felnőttkorban is észlelhetők. Számos endokrinológiai, neurokémiai és viselkedésbeli eltérés marad vissza, mint például a táplálkozási magatartás (Stricker-Krongrad et al., 1998), a kolinerg és adrenerg rendszerek eltérései (Frieder és Grimm, 1987), emellett tanulási deficitiek (Ali et al., 2000; Ishikawa et al., 1997; Klingberg et al., 1987; Kubo et al., 1993), a farokrángási latencia (Squibb et al., 1981), a motoros aktivitás (Ali et al., 2000; Squibb et al., 1981), és az ópioid analgészia (Bodnar et al., 1985) is változik. Ezzel ellentétben más paraméterek az állatok öregedésével javuló tendenciát mutatnak, mint például néhány endokrinológiai és motoros funkció (Klingberg et al., 1987; Lengvári, 1977). Felt et al. (2002) újszülött patkányokat kezeltek a glutamát analóg NMDA-val (N-metil-D-aszpartát) intrastriatalisan, melynek hatására az állatok az ellenoldali mellső láb ráhelyezési reflexben 2 hetes korban rosszabb teljesítményt nyújtottak, mint a kontroll egyedek, de későbbi életkorban teljesen eltűnt a különbség. A motoros koordinációs deficitiek későbbi helyreállása az újszülött agy nagyfokú plaszticitásával magyarázható. Számos bizonyíték van arra, hogy bizonyos neuronok funkcióját át tudják venni más agyterületek (Kartje-

Tillotson et al., 1985; Reinoso és Castro, 1989; Towfighi et al., 1994). Súlyosabb kérgi diszfunkció után is megfigyelhető jelentős javulás, mint például a ráhelyezési reflexnél kortikális sértést követően leírták a funkció helyreállítását (Barth és Stanfield, 1990). A kompenzatórikus változások egyénileg eltérőek, és ez lehet felelős azért, hogy a javulás eltérő mértékű a különféle idegrendszeri léziókat követően (Jansen és Low, 1996). Ilyen kompenzációs elváltozást írtak le a hippocampusban glutamát kezelés után (Beas-Zarate et al., 2002). Ugyanígy a környezeti hatások is serkenthetik a gyógyulást, amit számos idegrendszeri sérülés esetén leírtak. Ezek közé tartozik a nátrium-glutamát kezelés okozta károsodás, ugyanis az ingergazdag környezetben tartott glutamát-kezelt patkányok térbeli navigációs teszteljesítménye megközelíti a kontroll egyedekét (Saari et al., 1990). Diszkriminációs tesztekben pedig kimutatható, hogy glutamát kezelést követően a gyógyuláshoz szükséges, hogy az állatokkal a különböző feladatok végrehajtását gyakoroltassuk (Sisk et al., 1984).

## **4.2. Hypoxiás modell**

A hypoxiás félteke hozzávetőleg 50%-os atrófiája az idegrendszeri fejlődés retardációját eredményezi, ami a neurológiai reflexek késleltetett megjelenésében és rosszabb reflexteljesítési időkben, valamint a motoros koordinációs tesztekben nyújtott rosszabb teljesítményben nyilvánul meg. Azonban a maradandó súlyos cerebrális károsodás ellenére a legtöbb állat 6 hetes korra utolérte a kontroll egyedek szintjét a legtöbb tesztben, kivéve a lépéshiba tesztet. Az open-fieldben a hypoxiás állatok aktívabbak voltak 2 és 6 hetes korban.

Az alkalmazott hypoxia/ischaemia modell kiterjedt súlyos cerebrális atrófiát okoz, azonban az emberrel ellentétben a patkányok még ilyen súlyos mértékű neonatális hypoxia/ischaemia hatására sem mutatnak durva eltéréseket, ugyanúgy mozognak, mint a normális állatok és nem látható rajtuk egyértelmű poszturális és lokomotoros eltérés (Jansen és Low 1996). Ez magyarázható az embernél nagyobb mértékű idegrendszeri plaszticitással. Ugyanakkor számos funkcionális tesztben kimutatható rövid és hosszú távú deficit a neonatális hypoxiás/ischaemiás behatást követően. Ezen eltérések közül több esetben tapasztalható javulás idővel (Barth és Stanfield, 1990; Felt et al., 2002), míg

mások megmaradnak felnőttkorban is. Irodalmi adatok vannak arra, hogy a hypoxiás/ischaemiás állatok hosszútávú eltéréseket mutatnak olyan motoros koordinációs feladatokban, mint amilyen a mókuserék teszt (Jansen és Low, 1996). Rosszabb teljesítmény figyelhető meg a lépcsősor tesztben, ami a mellső végtag ügyességét méri (Tomimatsu et al., 2002). Hypoxiás/ischemiás léziót elszenvedett rágcsálók rövid és hosszútávú tanulási deficiteket is mutatnak (Arteni et al., 2003; Balduini et al., 2000, 2001; Buwalda et al., 1995; Ikeda et al., 2001, 2002; Ten et al., 2003; Wagner et al., 2002; Wang et al., 2002).

Az irodalmi adatokkal megegyezően azt találtuk, hogy a hypoxián átesett állatok szomatikus fejlődése károsodik, szignifikánsan kisebb tömegűek, mint a kontroll egyedek (Andine et al., 1990; Wagner et al., 2002). Ugyanakkor a súlybeli elmaradás nem okozott magasabb mortalitást, annak ellenére, hogy Wagner et al. (2002) olyan mértékű súlyvesztést írtak le, ami mesterséges táplálást tett szükségessé. Eredményeink azt mutatják, hogy a hypoxiás állatok rosszabbul teljesítenek a negatív geotaxisban, a felegyenesedési és elmozdulási reflexekben a mért reflexidők alapján. Ten et al. (2003) kimutatták, hogy a hypoxia egerekben 1 és 24 órával az inzultus után hátrányosan befolyásolja a felegyenesedési, mászási és geotaxis tesztekben nyújtott teljesítményt. A mi megfigyeléseink is alátámasztják ezeket a megfigyeléseket, rövid távon és későbbi időpontban is kimutathatóak az eltérések ezekben a tesztekben. A felegyenesedési reflex lassabb volt a megfigyelési idő egésze alatt, az elmozdulási reflex a 10-12. napokon, a geotaxis a 14-16. napon volt lassabb hypoxiás patkányokban, mint a kontroll állatoknál. Még később azonban a különbségek eltűnnek, ami arra utal, hogy a hypoxiás állatokban egy gyógyulási folyamat zajlott le.

A hypoxiás/ischaemiás léziót követően számos teszt végezhető a motoros koordináció vizsgálatára. Ennek ellenére sok vonatkozásban ellentmondásosak a különböző szerzők által leírt eredmények. Az egyik legszélesebb körben alkalmazott vizsgálat a mókuserék teszt, ami a motoros képességek mérésének érzékeny módszere hypoxiás léziót követően. Alkalmazható továbbá a vélt neuroprotektív szerek hatásának igazolására is. Elsősorban 3-9 hetes életkorban alkalmazható (Jansen és Low 1996; Jansen et al., 1997; Wagner et al., 2002). Ezen irodalmi eredményekkel ellentétben, hasonlóan a mi eredményeinkhez, Balduini et al. (2000) sem találtak eltérést a kontroll és a hypoxiás csoport között

mókuskerék illetve egyéb motoros koordinációs tesztekben. A mi megfigyeléseink szerint a legmegbízhatóbb vizsgálóeljárás a kontralaterális mellső végtag lépéshibáinak számolása, mivel a hypoxiás állatok a megfigyelési idő során végig többet hibáztak, mint a kontroll egyedek. Ez a károsodás volt kimutatható a lépcsősor tesztben is (Tomimatsu et al., 2002). Az, hogy a mellső végtag jobban károsodott azzal magyarázható, hogy a motoros kéregben a mellső végtag reprezentációs területét sokkal nagyobb mértékben érintette a sérülés, mint a hátsó végtagét. Ez a megfigyelés egybevág azzal az irodalmi adattal, miszerint felnőtt patkányban féloldali arteria cerebri media okkluziót követően a hátsó végtag mozgásai kevésbé károsodtak (Reglődi et al. 2002). Más tesztekkel is kimutathatóak voltak motoros koordinációs zavarok, mint például kapaszkodási, függeszkedési, rúdon egyensúlyozási és mozgás iniciációs tesztekben. Ugyanakkor a tapasztalt eltérések 5 hetes életkorra eltűntek, és a legtöbb hypoxiás állat erre az életkorra, vagy olykor már előbb is ugyanolyan teljesítményt mutatott, mint a kontroll egyedek. Néhány teszt, mint a testkilengés teszt és függőleges rács teszt inszenzitívnek bizonyult a károsodások kimutatására. Ezen tesztek annak ellenére voltak értékelhetetlenek, hogy az irodalomban sikeresen alkalmazták őket felnőtt patkányokon féloldali agyi ischaemiás sérülés következményeinek vizsgálatára (Aronowski et al, 1996; Borlongan et al., 1995; Markgraf et al., 1992; Reglődi et al., 2003; Rogers et al., 1997; Van der Staay et al., 1996). A mi vizsgálatainkban a súlyos agykárosodás ellenére sem voltak elég érzékenyek ezek a tesztek a kispatkányoknál. Ezen megfigyelésünk egybevág Balduini et al. (2000) eredményeivel, aki három tesztet alkalmazott a motoros koordináció vizsgálatára (mókuskerék, kémény és horizontális rács teszt), de egyikkel sem talált kimutatható eltérést hypoxiás és kontroll kispatkányok között. Noha a felnőtt patkányban is kimutatható gyógyulás a szenzoros és motoros tünetekben féloldali cerebrális ischaemiát követően (Reglődi et al., 2003), az újszülött patkányok szignifikánsan gyorsabban és nagyobb mértékben regenerálódnak. Ez az újszülött agy nagyobb mértékű plaszticitásának köszönhető (Balduini et al., 2000), ami az ellenoldali agyfélteke kompenzatórikus elváltozásait is eredményezi. Számos irodalmi adat van arra, hogy a újszülött agy plaszticitása enyhíti különféle károsító tényezők hatását az agyi funkciókra (Barth és Stanfield, 1990; Huttenlocher és Raichelson, 1989; Kartje-Tillotson et al., 1985; Reinoso és Castro, 1989).

Az open-field magatartással kapcsolatban mind hyper-, mind hypoaktivitásról beszámoltak a különböző szerzők hypoxiás/ischaemiás léziót követően (Antier et al., 1998; Balduini et al., 2000). Anoxiának kitett patkányban az elválasztást követő időszakban figyelhető meg átmeneti hyperaktivitás megemelkedett szaglászási, ágaskodási és mozgási aktivitással (Iuvone et al., 1996). Balduini et al. (2000, 2001) 3 hetes életkorban írtak le hyperaktivitást, de későbbi életkorban, 90 naposan nem találtak eltérést a spontán aktivitásban az open-field teszt során. Antier et al. (1998) ezzel ellentétesen hypoaktivitást figyeltek meg olyan felnőtt patkányokban, amelyeket neonatális hypoxiás/ischaemiás károsodásnak tettek ki. A mi eredményeink azt mutatják, hogy a hypoxiás állatok 2 hetes életkorban hyperaktívak, azonban ebben az életkorban a kontroll egyedek még alig mutatnak mozgási aktivitást. A kontroll egyedek annyira keveset mozogtak, hogy sok el sem hagyták az open-field közepén levő kiindulási helyet, míg a hypoxiás állatok a falak mellé másztak. Ez magyarázza azt, hogy mért töltöttek a hypoxiás állatok több időt 2 hetesen a falak mellett. A kispatkányok természetes védekező reflexe az open-fieldben, hogy a számukra biztonságot nyújtó fal mellé mozogtak. Mivel ez a thigmotaxisban megfigyelhető eltérés a későbbi életkorokban, mikor már a kontroll egyedek is eleget mozogtak az open-fieldben, eltűnt, a két hetesen észlelt eltérés nem a fokozott anxiatással magyarázható, noha annak hatása nem zárható ki. Három hetes életkorban tehát a kontroll egyedek is szignifikánsan aktívabban, mint két hetesen, ami magyarázza, hogy mért nem találtunk eltéréseket a kontroll és hypoxiás egyedek között ebben az életkorban. Ugyanakkor a kontroll állatok később nem mutattak a 3 hetes korhoz képest további fejlődést, a hypoxiás állatok aktivitása viszont tovább fokozódott 6 hetes életkorban, melyet az ágaskodások megnövekedett száma, a teljes megtett távolság, a mozgással töltött idő mértéke és a mozgási sebesség emelkedése jelez. Érdekesnek találtuk, hogy az open-fieldben tapasztalt nagyobb lépésszám ellenére a hypoxiás állatok kevesebbet léptek a lépésszám és lépéshiba teszt során a rácson. Ez arra utal, hogy mikor a mozgáshoz nagyobb mértékű koordinációs képesség kell, mint amilyen a rácson való járás, a hypoxiás állatok nem képesek azt olyan mértékben teljesíteni, kevésbé aktívaknak bizonyulnak, mint a kontrollok.

Az éretlen idegrendszer jelentős mértékű kompenzatórikus reorganizációra képes sérülés után. Ennek ellenére a legtöbb közleményben nagyfokú cerebrális atrófiát írtak le

hypoxiás/ischaemiás léziót követően (Andine et al., 1990; Jansen és Low, 1996; Jansen et al., 1997; Tour et al., 1995). Egyes szerzők a kontralaterális félteke kompenzatórikus megnagyobbodását írták le (Jansen és Low, 1996). Ismert, hogy az ellenoldali félteke a funkciók egy részét képes átvenni a sérült agyféltekétől patkányban, de még emberben is, (Barth és Stanfield, 1990; Benecke et al., 1991), makroszkóposan is megnyilvánuló hypertrophiát azonban nem igazoltak más szerzők (Arteni et al., 2003; Towfighi et al., 1994). Towfighi et al. (1994) nem találtak eltérést a hypoxiás állatok és a kontroll egyedek kontralaterális féltekéjének mérete között, és azt javasolják, hogy a sérült agyfélteke atrófiájának mértékét az ellenoldali ép félteke méretéhez viszonyítva számszerűsíthetve ajánlatos megadni. Ezen alapulva mi is az ellenoldali ép félteke méretét 100%-nak vettük, és ennek arányában fejeztük ki a károsodás mértékét, hasonlóan más szerzőkhöz, akik ugyanilyen hypoxiás/ischaemiás modellt használnak (Bona et al., 1997; Ten et al., 2003; Tomimatsu et al., 2002; Wagner et al., 2002). Eredményeink azt igazolják, hogy a hippocampus súlyosan károsodik, mérete mindössze 10%-a az ép oldalnak. Egyéb agyterületek, és a teljes agyfélteke mérete körülbelül 50%-os csökkenést mutat. Ilyen méretű károsodás megfelel az irodalomban leírt eltéréseknek (Andine et al., 1990; Jansen és Low 1996; Shin et al., 2004; Wagner et al., 2002). Az állandó kísérleti körülmények ellenére is nagymértékű variabilitást figyeltünk meg, melyet más szerzők szintén észleltek (Balduini et al., 2000; Grafe, 1994). Grafe et al. a károsodások széles skáláját észlelték a csak fokális neuronpusztulástól a masszív infarctusig (Grafe, 1994).

Összefoglalásként megállapíthatjuk, hogy a perinatális hypoxiás/ischaemiás károsodás erőteljesen befolyásolja a neurológiai reflexek megjelenését és az azokban nyújtott teljesítményt. A korai életkorban a motoros koordinációs tesztek szintén számos információval szolgálnak a hypoxiás és kontroll állatok teljesítménybeli különbségeiről, de későbbi életkorra a hypoxiás egyedek nagymértékű javulást mutatnak az alkalmazott tesztekben, a lépéshiba számolási teszt kivételével.



### 4.3. PACAP hatása a fejlődésre

Jelen munkánkban igazoltuk, hogy a születés napjától kezdve PACAP-kezelt újszülött patkányok szignifikánsan gyorsabb fejlődést mutatnak a kontroll csoporthoz képest egyes fizikális jellemzők megjelenésének napjában, számos neurológiai jelben és a felfedezési magatartásban.

Kísérletünkben azt találtuk, hogy a PACAP-kezelt állatok faciális fejlődése felgyorsult, míg a PACAP 6-38-kezelt egyedek fül kiegyenesedése és szemnyitása késett a kontroll csoporthoz képest. Az utóbbi években az arcfejlődés molekuláris szabályozásáról egyre többet derítettek fel. Számos olyan faktor ismert, mely az arcfejlődésben és az idegrendszer fejlődésében egyaránt részt vesz (Borella et al., 1997; Dam et al., 2000; Langman, 2000). A PACAP pontos szerepe egyelőre nem ismert, noha feltételezhető, hogy részt vesz az arcfejlődésben, mivel számos növekedési faktort stimulál és hat az agy fejlődésére is (Frechilla et al., 2001; Gloddek et al., 1999; Lohrer et al., 2001; Vaudry et al., 2000). A metszőfog kitörését és a szemnyitást többek között az epidermális növekedési faktor (EGF) és a transzformáló növekedési faktor (TGF) is befolyásolja (Borella et al., 1997; Cirulli és Alleva, 1994). A PACAP hatása ezekre a faktorokra még nem ismert, de legközelebbi homológjáról, a VIP-ről kimutatták, hogy stimulálja keratinocytákban a TGF expressziót (Sung et al., 1999). A retinolsav, ami a HOX gének expresszióját regulálja a faciális fejlődés során (Langman, 2000), bizonyítottan befolyásolja a PACAP termelődését is (Waschek et al., 1997). Ugyanígy a dúcléc elemei, melyekből az arc szöveteinek nagy része fejlődik (Langman, 2000), erőteljes PACAP illetve PACAP receptor expressziót mutatnak az embrionális fejlődés során (Sheward et al., 1998). Az, hogy a PACAP6-38-nak nem volt hatása a fogáttörés időpontjára, valószínűleg annak következménye, hogy a kezelés idején már nem volt érzékeny az adott szövet a PACAP hatására. Vaudry et al. (1999) szintén arra az eredményre jutottak, hogy a 8 napos patkányoknak adott PACAP antagonistá csupán kis mértékben csökkentette a cerebellum szemcsesejtjeinek számát. Az endogén illetve exogén PACAP az arcfejlődésre kifejtett pontos hatásának felderítése, hatásmechanizmusának tisztázása további kutatásokat igényel.

Patkányoknál a születés utáni első két hét az agy érésének azon szakasza, amely kritikus az érésben. Ez az időszak az utolsó intrauterin hónapok agyfejlődési időszakának felel meg emberben (Dobbing és Sands, 1973). A legtöbb neurológiai jel és reflex megjelenését serkentette a PACAP kezelés, míg az PACAP antagonistá kezelés csak a hátsó láb ráhelyezési reflexben mutatott késleltető hatást. A motoros fejlődés normális rostrocaudalis grádiense (Altman és Sudarshan, 1975) nem változott PACAP hatására, a mellső láb ráhelyezési- és fogóreflex minden esetben megelőzte a hátsó lábét. Ugyanakkor a mellső láb ráhelyezési- és a hátsó láb fogóreflexet az állatok PACAP kezelés hatására napokkal korábban mutatták, mint a kontroll egyedek, míg a PACAP antagonistá kezelés késleltette a hátsó láb ráhelyezési reflex megjelenését. A kezelések nem befolyásolták a felegyenesedési reflex, a negatív geotaxis és az elmozdulási reflex fejlődési mintázatát: minden állat a megfigyelési idő előrehaladtával szignifikánsan egyre jobb eredményeket ért el. Mindazonáltal a PACAP kezelt állatok az elmozdulási reflexben és negatív geotaxisban gyorsabban teljesítették a feladatot, mint a kontrollcsoport, míg a PACAP antagonistá ezekre nem volt hatással. A PACAP antagonistá kezelést kapott patkányok lassabbak voltak a felegyenesedési reflexben 2-6 napos korban a kontrollcsoportnál. Ezt a reflexet a 16. nap után nem mértük, mert minden állat azonnal megfordult a hátára helyezés után, ami összhangban van a poszturális fejlődés irodalmi leírásaival (Altman és Sudarshan, 1975). Ezek az eredmények bizonyítják, hogy a PACAP gyorsítja az összetett motoros képességek fejlődését. Az endogén PACAP hatásait tekintve az a következtetés vonható le, hogy hat a neonatális fejlődésre. Mivel a PACAP 6-38 nem befolyásolta jelentősen a jeleket, a kezelés valószínűleg kívül esett az érzékeny időszakon.

A PACAP kezelés szignifikáns javulást okozott a három hetes korban mért felfedező magatartásban is. A két hetes korban tapasztalt alacsony teljesítmény összhangban áll a patkányok normális posztnatális motoros fejlődésével (Altman és Sudarshan, 1975). Három hetes korban az egyedek szignifikánsan többet mozogtak, ami a leírások szerint megfelel a mozgások fejlődésében három hetes korra elért magasabb szintnek (Altman és Sudarshan, 1975). Tehát a PACAP kezelt csoport egyedei többet mozogtak, kevesebb időt töltöttek el egyes mezőkben, többször tértek vissza és több időt töltöttek a középpontban. Ezzel ellentétes eredményt mutattak a kontroll és PACAP antagonistá

kezelt állatok, miszerint több időt töltöttek el a falak mentén. A környezet határainak, a falak közelében való tartózkodás (thigmotaxis) a patkányok természetes védekező magatartásainak egyike, s mint ilyen, jelezheti számunkra az állat félelmét (Borella et al., 1997). Feltételezhetően a PACAP hatással bír a pszichomotoros és emocionális viselkedésekre, de a jelenlegi adatok nem egyértelműek. PACAP és PACAP receptor knockout egerek vizsgálatakor megfigyelhetőek az állatok viselkedésbeli eltérései, mint például többet mozognak, aktívabb a felfedező magatartást, spontán ugrásokat mutatnak és csökken a félelmük (Hashimoto et al., 2001; Otto et al., 2001). Másrészt a PACAP bizonyítottan növeli felnőtt patkányokban a spontán motoros aktivitást, és az ágaskodási magatartást (Masuo et al., 1995), illetve egerekben a mozgást és a mosakodási magatartást (Morley et al., 1992). Jelen tanulmányunkban a PACAP-kezelt állatok ugyanígy többször mutattak ágaskodó magatartást, ami a jobban fejlett vizsgálódó aktivitás jele (Altman és Sudarshan, 1975). Az open-field tesztben nyújtott jobb teljesítmény egyértelműen utal a PACAP kezelt állatok fejlettebb mozgási és felfedezési magatartására, de ezt részben okozhatja az állatok csökkent félelme is (Altman és Sudarshan, 1975; Borella et al., 1997; Roth és Katz, 1979). A fekális bólusok száma egyértelmű jelzője a félelemnek (Otto et al., 2001), de a csoportok közt nem tapasztaltunk semmilyen eltérést. Annak ellenére, hogy vizsgálatunk eredményiből az következne, hogy az egyedek jobb teljesítménye inkább a motoros és felfedezési magatartás nagyobb fejlettségének következménye, mint a félelem mértékének csökkenéséé, jelen adataink alapján nem vonható le végső következtetés.

A PACAP pontos hatása a neuronális fejlődésre nem ismert. Egy sokoldalú neuropeptidről van szó, számos hatással a központi és környéki idegrendszerben (Arimura, 1998; Sherwood et al., 2000; Vaudry et al., 2000). Viszonylag kevés adat van az irodalomban a PACAP *in vivo* idegrendszeri hatásairól. Kimutatták, hogy a PACAP alacsony dózisokban rendelkezik tanulást és memória feldolgozást serkentő hatással passzív elhárításos tesztekben (Sachetti et al., 2001; Telegdy és Kokavszky, 2000). A PACAP nemcsak kimutatható a hippocampusban, hanem részt vesz hippocampalis szinaptikus jelátviteli folyamatokban is (Masuo et al., 1992; Roberto és Brunelli 2000). Specifikus PACAP receptor (PAC1) deficiens egerek memóriaromlást mutatnak, melyet a hippocampalis moharostokon preszinaptikus PACAP receptor mediálta folyamatok

hiányával magyaráznak (Otto et al., 2001). Ezek a hatások összefüggésben lehetnek a *Drosophyla* memória gén (amnesiac) által kódolt protein és a PACAP között fennálló szerkezeti hasonlósággal (DeZazzo et al., 1999). A *Drosophyla* szaglási memóriájának kifejlődésében ezen gén által kódolt PACAP-szerű peptidok vesznek részt (DeZazzo et al., 1999).

Jelenleg kevés adat van a PACAP *in vivo* hatásairól a neonatális viselkedésre. Néhány tanulmány azonban bizonyítja, hogy a PACAP részt vesz az idegrendszer fejlődésének szabályozásában. Mind a PACAP, mind pedig receptora széles körben expresszálódik egér és béka velőcsőben, a patkány embriók agyának számos területén (Hu et al., 2001; Sheward et al., 1998; Skoglosa et al., 1999; Waschek et al., 1997), és feltételezhetően szerepe van az idegrendszeri mintázat formálásában és a neurogenesisben (Hansel et al., 2001; Waschek et al., 1997). A fejlődő kéregben nagy mennyiségű PACAP mRNS található a neuronális migráció és fokozott neurondifferenciáció idején (Skoglosa et al., 1999). A kisagyban a PACAP koncentrációja magasabb születés után, és néhány hét alatt a felnőtt szintre csökken, ami szintén a PACAP posztnatális neuronális fejlődésre kifejtett hatásának bizonyítéka (Nielsen et al., 1998). Az oligodendroglia sejtek fejlődése során a PACAP stimulálja a mitózist, azonban átmenetileg késlelteti a sejtek érését, és így a myelinizációt (Lee et al., 2001). A PACAP myelogenézist késleltető hatásának abban lehet szerepe, hogy így a szinaptikus kapcsolatok jobban kifejlődhetnek (Lee et al., 2001). Elektrofiziológiai módszerekkel kimutatták, hogy a PACAP excitátoros transzmitterként működik újszülött patkányok lumbosacralis vegetatív reflexeiben is (Miura et al., 2001). A PACAP neurotrófikus hatásának egyik legfontosabb feltételezett mechanizmusa a PACAP antiapoptotikus hatása a fejlődő idegrendszerben. Ezt számos *in vitro* tanulmány igazolja embrionális és felnőtt sejt kultúrában (Campard et al., 1997; Chang et al., 1996; Hartfield et al., 1998; Oka et al., 1999; Tabuchi et al., 2001; Tanaka et al., 1997). Az emberi PACAP génje a 18. kromoszómán helyezkedik el, abban a lókusztban, ami összefüggésbe hozható a holoprosencephalia egy formájával, egy ismert előagyi fejlődési rendellenességgel (Chang et al., 1993; Hosoya et al., 1992; Sherwood et al., 2000; Vaudry et al., 2000). Számos egyéb adat szól a PACAP szerepéről a cerebellaris neuronok, kérgi prekursor sejtek, oligodendrocyták és astrocyták differenciálódásában és proliferációjában (Basille et al., 1994; Campard et al., 1997;

Erhardt et al., 2001; Lee et al., 2001; Lu és DiCicco-Bloom, 1997; Nicot és DiCicco-Bloom, 2001, Przywara et al., 1998; Tabuchi et al., 2001; Vaudry et al., 2000; Zupan et al., 1998).

Hasonló eredmények vannak a PACAP legközelebbi rokon peptidjéről, a VIP-ről is. A VIP-ről kimutatták, hogy részt vesz az idegrendszer fejlődésében, és széles körű neuroprotektív hatásokkal rendelkezik. Számos tanulmány igazolja, hogy a VIP és analógjai neurotrófikus és neuroprotektív hatást mutatnak *in vitro* és különböző betegségek állatkísérletes modelljében *in vivo* (Ashur-Fabian et al., 1999; Gozes, 2001; Offen et al., 2000). Az idegrendszer fejlődésében betöltött szerepére utal, hogy a PACAP-hoz hasonlóan, kimutatható a dúclécben a fejlődés folyamán (Garcia-Arraras et al., 1987; Matsumoto, 1994), a velőcső származékaiban magas a VIP kötő kapacitás és embrionális sejtkultúrákban fokozza a növekedést (Washek, 1995). Többek között kimutatták, hogy a neonatális VIP kezelés védelmet nyújt a kísérletesen létrehozott periventricularis leukomaláciában, mely igen éretlen újszülöttek fehérállományi cisztikus elváltozása (Gressens et al., 1997, 1998, 1999). Intrauterin VIP antagonistá kezeléssel pedig microcephaliát okozott az újszülött egerekben (Gressens et al., 1994). Emellett újszülött patkányok VIP antagonistá kezeléssel késleltette a végtag ráhelyezési reflex, a fogóreflex és felegyenesedési reflex megjelenését, azonban VIP kezelésnek nem volt hatása (Hill et al., 1991). Feltételezhetően a VIP fontos meghatározója a komplex motoros viselkedések normális kifejlődésének (Hill et al., 1991). Hasonlóképpen jelen kutatásunk eredményei arra a következtetésre vezetnek, hogy a PACAP is részt vesz a motoros képességek kialakításában, és jelentősen képes azokat továbbfejleszteni. A posztnatális fejlődés szempontjából egyik legfontosabb tényező az újszülött patkányok tápláltsága (Smart és Dobbing, 1971), és noha néhány adat szól a PACAP folyadék- és táplálékfelvételt befolyásoló hatásáról (Chance et al., 1995; Morley et al., 1992; Puig de Parada et al., 1995), nem találtunk szignifikáns eltérést a különböző csoportokba tartozó állatok napi testsúlyában. Így a súlybeli eltérések nem magyarázhatják a PACAP kezelt patkányok jobb teljesítményét, a mögöttes hatásmechanizmus felderítésére további kutatások szükségesek.

#### **4.4. PACAP kezelés hatása glutamát-indukált lézióban**

A normál állatok fejlődését meggyorsító dózisú PACAP kezelés képes volt enyhíteni a glutamát-indukálta késleltetett fejlődést a felegyenesedési, mellső láb ráhelyezési és fogó reflexekben, és szignifikánsan javította a reflexteljesítményt az elmozdulási és a felegyenesedési reflexekben, valamint a motoros koordinációban két hetes életkorban. Ugyanakkor nem volt képes kivédeni a glutamát hatását a testsúly alakulására, és a nucleus arcuatusban bekövetkezett neuronpusztulást. Mivel a PACAP bizonyítottan képes átjutni a vér-agy gáton (Banks et al., 1996), legvalószínűbb az, hogy az alkalmazott szisztémás dózis nagysága nem volt elegendő a neuroprotekciónak az érintett területeken. Ez magyarázhatja azt az irodalmi megfigyelést, hogy a PACAP *in vivo* védő hatását csak lokális kezelések után tudja kifejteni (Vaudry et al., 2000; Gressens et al., 2000; Arimura et al., 1994). Az általunk megfigyelt enyhe védő hatás azonban mindenképpen reménykeltő, és további vizsgálatokra ösztönöz az optimális kezelési mód és dózis megtalálásához.

#### **4.5. Ingergazdag környezet**

Az idegrendszer fejlődése során alapvető jelentőségűek a környezeti ingerek. Noha a genetikai hatás erőteljes az egyéni fejlődésre, de a környezeti hatások hosszútávú hatásokkal bírnak. Mindkét fejlődést befolyásoló tényező zavara lehet különböző károsító hatásokra való fokozott hajlam, vagy neurodegeneratív folyamatok hátterében (Koehl et al., 2001).

Az ingergazdag környezet számos változást idéz elő az idegrendszerben, neurokémiai és morfológiai szinten egyaránt. A cortex vastagsága nő, növekszik a dendrittűskék denzitása a neuronokon, egyes neurotrófikus faktorok és receptoraik expressziója emelkedik és számos agyterületen fokozódik a neurogenesis (Franklin et al., 2006; Pham et al., 1999; Schneider et al., 2006; Segovia et al., 2006).

Azonban nem csak neurokémiai vagy morfológiai, hanem funkcionális eltérések is tapasztalhatók. Ingergazdag környezet hatására egyes tanulási tesztekben, a szociális

viselkedésben és az explorációs magatartásban is javul az állatok teljesítménye, valamint csökken félelemérzetük is (Fernandez-Teruel et al., 1997; Schneider et al., 2006; van der Harst et al., 2003).

Irodalmi adatok alapján az ingergazdag környezet képes csökkenteni változatos idegi károsodások negatív hatásait (Fischer és Peduzzi, 2007; Held et al., 1985; Iuvone et al., 1996; Saari et al., 2001; Schneider et al., 2001; Schneider et al., 2006). Adoleszcens korban alkalmazott ingergazdag környezet csökkenti a prenatális stressz negatív hatásait (Morley-Fletcher et al., 2003).

Az ingergazdag környezet hatásait vizsgáló tanulmányok többsége azonban felnőtt állatokon történtek, ahol az ingergazdag környezetbe csak az anyától való elválasztást követően, vagy már felnőttkorban kerültek a kísérleti egyedek. Keveset tudunk azonban arról, hogy a korai, születést követő időszakban milyen hatásai vannak az ingergazdag környezetnek.

Kísérleteinkben azt találtuk, hogy összességében nézve az ingergazdag környezetnek önmagában nincs jelentős befolyásoló hatása újszülött patkányok fejlődésére, annak ellenére, hogy bizonyított, hogy számos növekedési faktor, mint például a VEGF és BDNF expresszióját fokozza (Bengoetxea et al., 2008; Franklin et al., 2006; Landi et al., 2007). A súlyban tapasztalt csökkenés valószínűleg abból adódik, hogy az ingergazdag ketrecben az állatok többet mozognak a nagyobb élettérben az egymással és a rendelkezésükre álló tárgyakkal való játék során. A bonyolultabb motoros koordinációs tesztekben azonban szignifikánsan jobban teljesítettek az ingergazdag környezetben tartott állatok, mint a hagyományos ketrecben nevelkedettek. Az open-field tesztben az ingergazdag állatok három hetes korban aktívabbnak bizonyultak, ez elsősorban a habituációban nyilvánult meg. További kutatásokat igényel annak eldöntése, hogy a tapasztalt eltérések magának az ingergazdag környezetnek a hatására történtek, vagy pedig az ingergazdag környezetben az anyaállat megnövekedett gondoskodó magatartásának köszönhetőek-e. Ismert ugyanis, hogy a megnövekedett aktivitás önmagában is fokozza a BDNF szintet a patkányokban (Cotman et al., 2002), ugyanakkor viszont a megnövekedett anyai gondoskodás is emeli a BDNF mRNS expressziót a patkány hippocampusban (Liu et al., 2000). Ingergazdag környezet hatására

megemelkedik az anyaállat tejében az inzulinszerű növekedési faktor (IGF) szintje, ami gyorsítja a retina fejlődését az újszülött állatokban (Sale et al., 2007).

Összefoglalásként megállapíthatjuk, hogy az ingergazdag környezet a számos neurokémiai és morfológiai pozitív hatása ellenére nem gyorsítja jelentősen az újszülött patkányok fejlődését, azonban egyes bonyolultabb, összetett motoros koordinációt igénylő tesztekben az ingergazdag környezetben nevelt állatok jelentősen jobb teljesítményre képesek.

#### **4.6. Ingergazdag környezet hatása nátrium-glutamát kiváltotta toxikus lézióban**

Ebben a kísérletben csak az alacsony dózisu (2mg/testtömeg gramm) nátrium-glutamát kezelést próbáltuk ki. Ez a dózis képes már előidézni a súlyos neurodegenerációt a retinában és a nucleus arcuatusban. Ugyanakkor ennek a dózishnak csupán enyhébb hatása van az általunk vizsgált neurológiai, motoros koordinációs és open-field tesztekben. Ezt, a 3.1. fejezetben leírtól enyhébb fokú károsodást azonban nagymértékben csökkentette az ingergazdag környezet. Ezek alapján úgy tűnik számunkra, hogy ugyan az ingergazdagság önmagában nem változtatja jelentősen a fejlődés menetét, azonban egyfajta rezervet képez, ami a károsító behatásokkal szembeni nagyobb ellenálló képességet, és az azokból való jobb felépülést eredményez. Jelen PhD. dolgozat témájába ugyan nem tartozik bele, azonban megemlítenő, hogy munkacsoportunk előzetes eredményei alapján a retinális degenerációban igen jelentősnek bizonyult az ingergazdag környezet protektív hatása.



## 4.7. Új eredmények összefoglalása

Az irodalomból vett különböző neurológiai és motoros koordinációs, valamint viselkedési tesztekkel egy standardizálható rendszert hoztunk létre. Ennek segítségével vizsgálható újszülött patkányokban széles spektrumban a korai posztnatális idegi fejlődés.

Ennek a tesztrendszernek a segítségével kimutattuk a perinatális nátrium-glutamát kezelés negatív, a fejlődést jelentősen késleltető hatását. Ezt a károsító hatást ingergazdag környezet és a (neurotrófikus faktorok családjába tartozó, peptid) PACAP kezelés képes volt csökkenteni.

Perinatális hypoxia/ischaemia modellen is kimutattuk a kezelés rövid távú negatív következményeit, melyek prognosztikai jelentőségűek lehetnek.

Kimutattuk, hogy normál újszülött patkányok posztnatális fejlődését szisztémásan adott PACAP kezelés önmagában gyorsítani képes, míg az antagonistá PACAP6-38 adása enyhén késlelteti a fejlődést.

Az ingergazdag környezetnek önmagában csak csekély hatása van a fejlődés ütemére, egyes bonyolultabb, fejlett motoros koordinációt igénylő tesztekben azonban jobban teljesítenek az ingergazdag környezetben nevelt állatok.

## 5. Irodalom

- Adriani W, Seta DD, Dessi-Fulgheri F, Farabollini F, Laviola G (2003). Altered profiles of spontaneous novelty seeking, impulsive behavior and response to D-amphetamine in rats perinatally exposed to bisphenol A. *Environ. Health Perspect.* 111, 395-401.
- Ali MM, Bawari M, Misra UK, Babu GN (2000). Locomotor and learning deficits in adult rats exposed to monosodium-L-glutamate during early life. *Neurosci. Lett.* 284, 57-60.
- Altman J, Sudarshan K (1975). Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim. Behav.* 23, 896-920.
- Andine P, Thordstein M, Kjellmer I, Nordborg C, Thiringer K, Wennberg E, Hagberg H (1990). Evaluation of brain damage in a rat model of neonatal hypoxic-ischemia. *J Neurosci. Meth.* 35, 253-260.
- Antier D, Zhang BL, Mailliet F, Akoka S, Pourcelot L, Sannajust F (1998). Effects of neonatal focal cerebral hypoxia-ischemia on sleep-waking pattern, EcoG power spectra and locomotor activity in the adult rat. *Brain Res.* 807, 29-37.
- Araujo PE, Mayer J (1973). Activity increase associated with obesity induced by monosodium glutamate in mice. *Am. J. Physiol.* 225, 764-765.
- Archer T, Palomo T, Fredriksson A (2002). Neonatal 6-hydroxydopamine-induced hypo/hyperactivity: blockade by dopamine reuptake inhibitors and effect of acute D-amphetamine. *Neurotox. Res.* 4, 247-266.
- Archer T, Schroder N, Fredriksson A (2003). Neurobehavioural deficits following postnatal iron overload: II Instrumental learning performance. *Neurotox. Res.* 5, 77-94.
- Arees EA, Mayer J (1970). Monosodium glutamate-induced brain lesions: electron microscopic examination. *Science* 170, 549-550.
- Arimura A (1998). Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine and nervous systems. *Jpn. J. Physiol.* 48, 301-331.

- Arimura A, Somogyvári-Vigh A, Weill C, Fiore RC, Tatsuno I, Bay V, Brenneman DE (1994). PACAP functions as a neurotrophic factor. *Ann. NY. Acad. Sci.* 739, 228-243.
- Aronowski J, Samways E, Strong R, Rhoades HM, Grotta JC (1996). An alternative method for the quantification of neuronal damage after experimental middle cerebral artery occlusion in rats: analysis of behavioral deficits. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 16, 705-713.
- Arteni NS, Salgueiro J, Torres I, Achaval M, Netto CA (2003). Neonatal cerebral hypoxia-ischemia causes lateralized memory impairments in the adult rat. *Brain Res.* 973, 171-178.
- Ashur-Fabian O, Perl O, Lilling G, Fridkin M, Gozes I (1999). SNV, a lipophilic superactive VIP analog, acts through cGMP to promote neuronal survival. *Peptides* 20, 629-633.
- Babai N, Atlasz T, Tamás A, Reglődi D, Kiss P, Gábrriel R (2005). Degree of damage compensation by various PACAP treatments in monosodium glutamate-induced retina degeneration. *Neurotox. Res.* 8, 227-233.
- Babai N, Atlasz T, Tamás A, Reglődi D, Tóth G, Kiss P, Gábrriel R (2006). Search for the optimal monosodium glutamate treatment schedule to study the neuroprotective effects of PACAP in the retina. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1070, 149-155.
- Balduini W, De Angelis V, Mazzoni E, Cimino M (2000). Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res.* 859, 318-325.
- Balduini W, De Angelis V, Mazzoni E, Cimino M (2001). Simvastatin protects against long-lasting behavioral and morphological consequences of neonatal hypoxic/ischemic brain injury. *Stroke* 32, 2185-2191.
- Banks WA, Uchida D, Arimura A, Somogyvári-Vigh A, Shioda S (1996). Transport of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide across the blood-brain barrier and the prevention of ischemia-induced death of hippocampal neurons. *Ann. NY. Acad. Sci.* 805, 270-277.
- Bardo MT, LP Dwoskin (2004). Biological connection between novelty- and drug-seeking motivational systems. *Nebr. Symp. Motiv.* 50, 127-158.

- Barth TM, Stanfield BB (1990). The recovery of forelimb-placing behavior in rats with neonatal unilateral cortical damage involves the remaining hemisphere. *J. Neurosci.* 10, 3449-3459.
- Basille M, Gonzalez BJ, Fournier A, Vaudry H (1994). Ontogeny of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) receptors in the rat cerebellum: a quantitative autoradiographic study. *Dev. Brain Res.* 82, 81-89.
- Beas-Zarate C, Perez-Vega MI, Gonzalez-Burgos I (2002). Neonatal exposure to monosodium L-glutamate induces loss of neurons and cytoarchitectural alterations in hippocampal CA1 pyramidal neurons of adult rats. *Brain Res.* 952, 275-281.
- Beaulieu CL (2002). Rehabilitation and outcome following pediatric traumatic brain injury. *Surg. Clin. North Am.* 82(2), 393-408
- Benecke R, Meyer BU, Freund HJ (1991). Reorganization of descending motor pathways in patients after hemispherectomy and severe hemispheric lesions demonstrated by magnetic brain stimulation. *Exp. Brain Res.* 83, 419-426.
- Bengoetxea H, Argandoña EG, Lafuente JV (2008). Effects of visual experience on vascular endothelial growth factor expression during the postnatal development of the rat visual cortex. *Cereb. Cortex.* 18, 1630-1639.
- Beninger RJ, Jhamandas A, Aujla H, Xue L, Dagnone RV, Boegman RJ, Jhamandas K (2002). Neonatal exposure to the glutamate receptor antagonist MK-801: effects on locomotor activity and pre-pulse inhibition before and after sexual maturity in rats. *Neurotox. Res.* 4, 477-488.
- Berger R, Garnier Y (1999). Pathophysiology of perinatal brain damage. *Brain Res. Reviews* 30, 107-134.
- Bona E, Johansson BB, Hagberg H (1997). Sensorimotor function and neuropathology five to six weeks after hypoxia-ischemia in seven-day-old rats. *Pediatr. Res.* 42, 678-683.
- Borella A, Bindra M, Whitaker-Azmitia PM (1997). Role of the 5-HT1A receptor in development of the neonatal rat brain: preliminary behavioral studies. *Neuropharmacology* 36, 445-450.

- Borlongan CV, Cahill DW, Sanberg PR (1995). Locomotor and passive avoidance deficits following occlusion of the middle cerebral artery. *Physiol. Behav.* 58, 909-917.
- Bowers WJ, Nakai JS, Chu I, Wade MG, Moir D, Yagminas A, Gill S, Pulido O, Mueller R (2004). Early developmental neurotoxicity of a PCB/organochlorine mixture in rodents after gestational and lactational exposure. *Toxicol. Sci.* 77, 51-62.
- Bures J, Buresova O, Huston JP (1983). Techniques and basic experiments for the study of brain and behavior. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 77-97.
- Buwalda B, Nyakas Cs, Vosselman HJ, Luiten PGM (1995). Effects of early postnatal anoxia on adult learning and emotion in rats. *Behav. Brain Res.* 67, 85-90.
- Campard PK, Crochemore C, Rene F, Monnier D, Koch B, Loeffler JP (1997). PACAP type I receptor activation promotes cerebellar neuron survival through the cAMP/PKA signaling pathway. *DNA Cell Biol.* 16, 323-333.
- Chance WT, Thompson H, Thomas I, Fischer JE (1995). Anorectic and neurochemical effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in rats. *Peptides* 16, 1511-1516.
- Chang E, Welch S, Luna J, Giacalone J, Francke U (1993). Generation of a human chromosome 18-specific YAC clone collection and mapping of 55 unique YACs by FISH and fingerprinting. *Genomics* 17, 393-402.
- Chang JY, Korolev VV, Wang JZ (1996). Cyclic AMP and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) prevent programmed cell death of cultured rat cerebellar granule cells. *Neurosci. Lett.* 206, 181-184.
- Chaparro-Huerta V, Rivera-Cervantes MC, Torres-Mendoza BM, Beas-Zarate C (2002). Neuronal death and tumor necrosis factor- $\alpha$  response to glutamate-induced excitotoxicity in the cerebral cortex of neonatal rats. *Neurosci. Lett.* 333, 95-98.
- Cirulli F, Alleva E (1994). Effects of repeated administration of EGF and FGF-alpha on mouse neurobehavioral development. *Neurotoxicology* 15, 819-825.
- Cotman CW, Berchtold NC (2002). Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.* 25(6), 295-301.

- Dam K, Seidler FJ, Slotkin TA (2000). Chlorpyrifos exposure during a critical neonatal period elicits gender-selective deficits in the development of coordination skills and locomotor activity. *Dev. Brain Res.* 121, 179-187.
- Dawson R, Lorden JF (1981). Behavioral and neurochemical effects of neonatal administration of monosodium L-glutamate in mice. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 95, 71-84.
- Dawson R (1986). Developmental and sex-specific effects of low dose neonatal monosodium glutamate administration on mediobasal hypothalamic chemistry. *Neuroendocrinology* 42, 158-166.
- DeZazzo J, Xia S, Christensen J, Velinzon K, Tully T (1999). Development expression of an amn+ transgene rescues the mutant memory defect of amnesic adults. *J. Neurosci.* 19, 8740-8746.
- Dobbing J, Sands J (1973). Quantitative growth and development of human brain. *Arch. Dis. Child* 48, 757-767.
- Donatelle JM (1977). Growth of the corticospinal tract and the development of placing reactions in the postnatal rat. *J. Comp. Neurol.* 175, 207-232.
- Dubovicky M, Tokarev D, Skultetyova I, Jezova D (1997). Changes in exploratory behavior and its habituation in rats neonatally treated with monosodium glutamate. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 56, 565-569.
- Dunn AJ, Webster EL (1985). Neonatal treatment with monosodium glutamate does not alter grooming behavior induced by novelty or adrenocorticotrophic hormone. *Behav. Neur. Biol.* 44, 80-89.
- Erhardt NM, Fradinger EA, Cervini LA, Rivier JE, Sherwood NM (2001). Early expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and activation of its receptor in chick neuroblasts. *Endocrinology* 142, 1616-1625.
- Felt BT, Schallert T, Shao J, Liu Y, Li X, Barks JD (2002). Early appearance of functional deficits after neonatal excitotoxic and hypoxic-ischemic injury: fragile recovery after development and role of the NMDA receptor. *Dev. Neurosci.* 24, 418-425.

- Fernandez B, Romero EM, Kitchen I, Viveros MP (2000). Postnatal naltrindole treatments induce behavioral modifications in preweanling rats. *Neurosci. Lett.* 283, 73-76.
- Fernandez-Teruel A, Escorihuela RM, Castellano B, Gonzalez B, Tobena A (1997). Neonatal handling and environmental enrichment effects on emotionality, novelty/reward seeking, and age-related cognitive and hippocampal impairments: focus on the Roman rat lines. *Behav. Gen.* 27, 513-526.
- Fischer FR, Peduzzi JD (2007). Functional recovery in rats with chronic spinal cord injuries after exposure to an enriched environment. *J. Spinal Cord Med.* 30, 147-155.
- Fisher KN, Turner RA, Pineault G, Kleim J, Saari MJ (1991). The postweaning housing environment determines expression of learning deficit associated with neonatal monosodium glutamate (MSG). *Neurotoxicol. Teratol.* 13, 507-513.
- Fox, WM (1965). Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Anim. Behav.* 13, 234-241.
- Franklin TB, Murphy JA, Myers TL, Clarke DB, Currie RW (2006). Enriched environment during adolescence changes brain-derived neurotrophic factor and TrkB levels in the rat visual system but does not offer neuroprotection to retinal ganglion cells following axotomy. *Brain Res.* 1095, 1-11.
- Frechilla D, Garcia-Osta A, Palacios S, Cenarruzabietia E, Del Rio J (2001). BDNF mediates the neuroprotective effect of PACAP38 on rat cortical neurons. *Neuroreport* 12, 919-923.
- Frieder B, Grimm VE (1987). Prenatal monosodium glutamate causes long-lasting cholinergic and adrenergic changes in various brain regions. *J. Neurochem.* 48, 1359-1365.
- Garcia-Ararras JE, Chanconie M, Ziller C, Fauquet M (1987). In vivo and in vitro expression of vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactivity by neural crest derivatives. *Dev. Brain Res.* 33, 255-265.
- Gloddek J, Pagotto U, Paez Pereda M, Arzt E, Stalla GK, Renner U (1999). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, interleukin-6 and glucocorticoids

- regulate release of vascular endothelial growth factor in pituitary folliculostellate cells. *J. Endocrinol.* 160, 483-490.
- Gonzalez-Burgos I, Perez-Vega MI, Beas-Zarate C (2001). Neonatal exposure to monosodium glutamate induces cell death and dendritic hypotrophy in rat prefrontocortical pyramidal neurons. *Neurosci. Lett.* 297, 69-72.
- Gozes I (2001). Neuroprotective peptide drug delivery and development: potential new therapeutics. *Trends Neurosci.* 24, 700-705.
- Grafe MR (1994). Developmental changes in the sensitivity of the neonatal rat brain to hypoxic/ischemic injury. *Brain Res.* 653, 161-166.
- Gressens P, Besse L, Robberecht P, Gozes I, Fridkin M, Evrard P (1999). Neuroprotection of the developing brain by systemic administration of vasoactive intestinal peptide derivatives. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288, 1207-1213.
- Gressens P, Hill JM, Paindaveine B, Gozes I, Fridkin M, Brenneman DE (1994). Severe microcephaly induced by blockade of vasoactive intestinal peptide function in the primitive neuroepithelium in the mouse. *J. Clin. Invest.* 94, 2020-2027.
- Gressens P, Marret S, Hill JM, Brenneman DE, Gozes I, Fridkin M, Evrard P (1997). Vasoactive intestinal peptide prevents excitotoxic cell death in the murine developing brain. *J. Clin. Invest.* 100, 390-397.
- Gressens P, Marret S, Martin JL, Laquerriere A, Lombet A, Evrard P (1998). Regulation of neuroprotective action of vasoactive intestinal peptide in the murine developing brain by protein kinase C and mitogen-activated protein kinase cascades: in vivo and in vitro studies. *J. Neurochem.* 70, 2574-2584.
- Gressens P, Arquíe C, Hill JM, Marret S, Sahir N, Robberecht P, Evrard P (2000). VIP and PACAP38 modulate ibotenate-induced neuronal heterotopias in the newborn hamster neocortex. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 59, 1051-1062.
- Hansel DE, Eipper BA, Ronnett GV (2001). Regulation of olfactory neurogenesis by amidated neuropeptides. *J. Neurosci. Res.* 66, 1-7.
- Hansel DE, May V, Eipper BA, Ronnett GV (2001). Pituitary adenylate cyclase activating peptides and  $\alpha$ -amidation in olfactory neurogenesis and neuronal survival in vitro. *J. Neurosci.* 21, 4625-4636.



- Harry CJ (1998). Developmental neurotoxicology, In: Korach KS (Ed.), *Reproductive and Developmental Toxicology* (Marcel Dekker, Inc), 211-257.
- Hartfield PJ, Bilney AJ, Murray AW (1998). Neurotrophic factors prevent ceramide-induced apoptosis downstream of c-Jun N-terminal kinase activation in PC12 cells. *J. Neurochem.* 71, 161-169.
- Hashimoto H, Shintani N, Tanaka K, Mori W, Hirose M, Matsuda T, Sakaue M, Miyazaki J, Niwa H, Tashiro F, Yamamoto K, Koga K, Tomimoto S, Kunugi A, Suetake S, Baba A (2001). Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 13355-13360.
- Heath DL, Vink R (1997). Magnesium sulphate improves neurologic outcome following severe closed head injury in rats. *Neurosci. Lett.* 228, 175-178.
- Hebb DO (1949). *The Organisation of Behavior: a Neuropsychological Theory*. Wiley: New York.
- Heiman ML, Ben-Jonathan N (1983). Increase in pituitary dopaminergic receptors after monosodium glutamate treatment. *Am. J. Physiol.* 245, E261-265.
- Held JM, Gordon J, Gentile AM (1985). Environmental influences on locomotor recovery following cortical lesions in rats. *Behav. Neurosci.* 99, 678-690.
- Heyser CJ, Pellitier M, Ferris JS (2004). The effects of methylphenidate on novel object exploration in weanling and periadolescent rats. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1021, 465-469.
- Hill JM, Gozes I, Hill JL, Fridkin M, Brenneman DE (1991). Vasoactive intestinal peptide antagonist retards the development of neonatal behaviors in the rat. *Peptides* 12, 187-92.
- Hlinak Z, Gandalovicova D, Krejci I (2005). Behavioral deficits in adult rats treated neonatally with glutamate. *Neurotoxicol. Teratol.* 27, 465-473.
- Hosoya M, Kimura C, Ogi K, Ohkubo S, Miyamoto Y, Kugoh H, Shimizu M, Onda H, Oshimura M, Arimura A, Fujino M (1992). Structure of the human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene. *Biochem. Biophys. Acta* 1129, 199-206.

- Hu Z, Lelievre V, Rodriguez WI, Tam J, Cheng JW, Chen-Cory S, Waschek JA (2001). Embryonic expression of pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide and its selective type I receptor gene in the frog *Xenopus laevis* neural tube. *J. Comp. Neurol.* 441, 266-275.
- Huttenlocher PR, Raichelson RM (1989). Effects of neonatal hemispherectomy on location and number of corticospinal neurons in the rat. *Dev. Brain Res.* 47, 59-69.
- Ikeda T, Mishima K, Yoshikawa T, Iwasaki K, Fujiwara M, Xia YX, Ikenoue T (2001). Selective and long-term learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats. *Behav. Brain Res.* 118, 17-25.
- Ikeda T, Mishima K, Yoshikawa T, Iwasaki K, Fujiwara M, Xia YX, Ikenoue T (2002). Dexamethasone prevents long-lasting learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats. *Behav. Brain Res.* 136, 161-170.
- Ishikawa K, Kubo T, Shibasaki S, Matsumoto A, Hata H, Atai S (1997). Hippocampal degeneration inducing impairment of learning in rats: model of dementia? *Behav. Brain Res.* 83, 39-44.
- Iuvone L, Gelose MC, Dell'Anna E (1996). Changes in open field behavior, spatial memory, and hippocampal parvalbumine immunoreactivity following enrichment in rats exposed to neonatal anoxia. *Exp. Neurol.* 139, 25-33.
- Iwata S, Ichimura M, Matsusawa Y, Takasaki Y, Sasaoka M (1979). Behavioral studies in rats treated with monosodium l-glutamate during the early stages of life. *Toxicol. Lett.* 4, 345-357.
- Jansen EM, Low WC (1996). Long-term effects of neonatal ischemic-hypoxic brain injury on sensorimotor and locomotor tasks in rats. *Behav. Brain Res.* 78, 189-194.
- Jansen EM, Low WC (1996). Quantitative analysis of contralateral hemisphere hypertrophy and sensorimotor performance in adult rats following unilateral neonatal ischemic-hypoxic brain injury. *Brain Res.* 708, 93-99.
- Jansen EM, Solberg L, Underhill S, Wilson S, Cozzari C, Hartman BK, Faris PL, Low WC (1997). Transplantation of fetal neocortex ameliorates sensorimotor and

- locomotor deficits following neonatal ischemic-hypoxic brain injury in rats. *Exp. Neurol.* 147, 487-497.
- Kabbaj M, Devine DP, Savage VR, Akil H (2000). Neurobiological correlates of individual differences in novelty-seeking behavior in the rat: differential expression of stress-related molecules. *J. Neurosci.* 20, 6983-6988.
- Kartje-Tillotson G, Neafsey EJ, Castro AJ (1985). Electrophysiological analysis of motor cortical plasticity after cortical lesions in newborn rats. *Brain Res.* 332, 103-111.
- Katz RJ (1983). Neonatal monosodium glutamate differentially alters two models of behavioral activity in conjunction with reduced hypothalamic endorphins. *Physiol. Behav.* 31, 147-151.
- Kim YW, Choi DW, Park YH, Huh JY, Won KC, Choi KH, Park SY, Kim JY, Lee SK (2005). Leptin-like effects of MTII are augmented in MSG-obese rats. *Regul. Pept.* 127, 63-70.
- Kiss P, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Szalai M, Hauser D, Horváth Zs, Racz B, Gabriel R, Babai N, Tóth G, Reglodi D (2006). Effects of systemic PACAP treatment in monosodium glutamate-induced behavioral changes and retinal degeneration. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1070, 365-370.
- Kiss P, Tamás A, Lubics A, Szalai M, Szalontay L, Lengvari I, Reglódi D (2005). Development of neurological reflexes and motor coordination in rats neonatally treated with monosodium glutamate. *Neurotox. Res.* 8, 235-244.
- Klingberg H, Brankack J, Klingberg F (1987). Long-term effects on behavior after postnatal treatment with monosodium-L-glutamate. *Biomed. Biochim. Acta* 46, 705-711.
- Koehl M, Lemaire V, Vallée M, Abrous N, Piazza PV, Mayo W, Maccari S, Le Moal M (2001). Long term neurodevelopmental and behavioral effects of perinatal life events in rats. *Neurotox. Res.* 3(1), 65-83.
- Kostrzewa RM, Kostrzewa JP, Brus R (2003). Dopamine receptor supersensitivity: an outcome and index of neurotoxicity. *Neurotox. Res.* 5, 111-118.
- Kubo T, Kohira R, Okano T, Ishikawa K (1993). Neonatal glutamate can destroy the hippocampal CA1 structure and impair discrimination learning in rats. *Brain Res.* 616, 311-314.

- Landi S, Sale A, Berardi N, Viegi A, Maffei L, Cenni MC (2007). Retinal functional development is sensitive to environmental enrichment: a role for BDNF. *FASEB J.* 21, 130-139.
- Langman's Medical Embriology, ed. Sadler TW (2000). Lippincott Williams and Wilkins. 357-380.
- Le Roy I, Perez-Diaz F, Cherfouh A, Roubertoux PL (1999). Preweanling sensorial and motor development in laboratory mice: quantitative trait loci mapping. *Dev. Psychobiol.* 34, 138-158.
- Ledig M, Misslin R, Vogel E, Holownia A, Copin JC, Tholey G (1998). Paternal alcohol exposure: developmental and behavioral effects on the offspring of rats. *Neuropharmacology* 37, 57-66.
- Lee M, Lelievre V, Zhao P, Torres M, Rodriguez W, Byun JY, Doshi S, Ioffe Y, Gupta G, Monteros AE, Vellis J, Waschek J (2001). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide stimulates DNA synthesis but delays maturation of oligodendrocyte progenitors. *J. Neurosci.* 21. 3849-3859.
- Lengvári I (1977). Effect of perinatal monosodium glutamate treatment on endocrine functions of rats in maturity. *Acta Biol. Hung.* 28, 133-141.
- Lin JY, Pan JT (1999). Single-unit activity of dorsomedial arcuate neurons and diurnal changes of tuberoinfundibular dopaminergic neuron activity in female rats with neonatal monosodium glutamate treatment. *Brain Res. Bull.* 48, 103-108.
- Liu D, Diorio J, Day JC, Francis DD, Meaney MJ (2000). Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nat. Neurosci.* 3, 799-806.
- Lohrer P, Gloddek J, Hopfner U, Losa M, Uhl E, Pagotto U, Stalla GK, Renner U (2001). Vascular endothelial growth factor production and regulation in rodent and human pituitary tumor cells in vitro. *Neuroendocrinology* 74, 95-105.
- Lu N, DiCicco-Bloom E (1997). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is an autocrine inhibitor of mitosis in cultured cortical precursor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3357-3362.
- Lubics A, Reglódi D, Tamás A, Kiss P, Szalai M, Szalontay L, Lengvári I (2005). Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. *Behav. Brain Res.* 157, 157-165.

- Markgraf CG, Green EJ, Hurwitz BE, Morikawa E, Dietrich WD, McCabe PM, Ginsberg MD, Schneiderman N (1992). Sensorimotor and cognitive consequences of middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res.* 575, 238-246.
- Markus EJ, Petit TL (1987). Neocortical synaptogenesis, aging, and behavior: lifespan development in the motor-sensory system of the rat. *Exp. Neurol.* 96, 262-278.
- Masuo Y, Noguchi J, Morita S, Matsumoto Y (1995). Effects of intracerebroventricular administration of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on the motor activity and reserpine-induced hypothermia in murines. *Brain Res.* 700, 219-226.
- Masuo Y, Ohtaki T, Masuda Y, Fujino M (1992). Binding sites for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP): comparison with vasoactive intestinal polypeptide (VIP) binding site localization in rat brain. *Brain Res.* 575, 113-123.
- Matsumoto SG (1994). Neuronal differentiation in cultures of murine neural crest. I. Neurotransmitter expression. *Dev. Brain Res.* 83, 1-16.
- Miquel M, Font L, Sanchis-Segura C, Aragon CM (2003). Neonatal administration of monosodium glutamate prevents the development of ethanol- but not psychostimulant-induced sensitization: a putative role of the arcuate nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 17, 2163-2170.
- Mistlberger RE, Antle MC (1999). Neonatal monosodium glutamate alters circadian organization of feeding, food anticipatory activity and photic masking in the rat. *Brain Res.* 842, 73-83.
- Miura A, Kawatani M, de Groat WC (2001). Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on lumbosacral preganglionic neurons in the neonatal rat spinal cord. *Brain Res.* 895, 223-232.
- Miyabo S, Yamamura I, Ooya E, Aoyagi N, Horikawa Y, Hayashi S (1985). Effects of neonatal treatment with monosodium glutamate on circadian locomotor rhythm in the rat. *Brain Res.* 339, 201-208.
- Morley JE, Horowitz M, Morley PMK, Flood JF (1992). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) reduces food intake in mice. *Peptides* 13, 1133-1135.

- Morley-Fletcher S, Rea M, Maccari S, Laviola G (2003). Environmental enrichment during adolescence reverses the effects of prenatal stress on play behaviour and HPA axis reactivity in rats. *Eur. J. Neurosc.* 18, 3367-3374.
- Nakagawa T, Ukai K, Ohyama T, Gomita Y, Okamura H (2000). Effects of chronic administration of sibutramine on body weight, food intake and motor activity in neonatally monosodium glutamate-treated obese female rats: relationship of antiobesity effect with monoamines. *Exp. Anim.* 49, 239-249.
- Nicot A, DiCicco-Bloom E (2001). Regulation of neuroblast mitosis is determined by PACAP receptor isoform expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 4758-4763.
- Nielsen HS, Hannibal J, Fahrenkrug J (1998). Expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the postnatal and adult rat cerebellar cortex. *Neuroreport* 9, 2639-2642.
- Offen D, Sherki Y, Melamed E, Fridkin M, Breneman DE, Gozes I (2000). Vasoactive intestinal peptide (VIP) prevents neurotoxicity in neuronal cultures: relevance to neuroprotection in Parkinson's disease. *Brain Res.* 854, 257-262.
- Oka H, Jin L, Kulig E, Scheithauer BW, Lloyd RV (1999). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide inhibits transforming growth factor- $\beta$ 1-induced apoptosis in a human pituitary adenoma cell line. *Am. J. Physiol.* 155, 1893-1900.
- Olney JW (1969). Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164, 719-721.
- Otto C, Kovalchuk Y, Wolfer DP, Gass P, Martin M, Zuschratter W, Grone HJ, Kellendonk C, Tronche F, Maldonado R, Lipp HP, Konnerth A, Schutz G (2001). Impairment of mossy fiber long-term potentiation and associative learning in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type I receptor-deficient mice. *J Neurosci.* 21, 5520-5527.
- Otto C, Martin M, Wolfer DP, Lipp HP, Maldonado R, Schutz G (2001). Altered emotional behavior in PACAP-type-I-receptor-deficient mice. *Molec. Brain Res.* 92, 78-84.
- Palomo T, Beninger RJ, Kostrzewa RM, Archer T (2003). Brain sites of movement disorder: genetic and environmental agents in neurodevelopmental perturbations. *Neurotox. Res.* 5, 1-26.

- Pesini P, Rois JL, Menendez L, Vidal S (2004). The neonatal treatment of rats with monosodium glutamate induces morphological changes in the subfornical organ. *Acta Histol. Embryol.* 33, 273-277.
- Pham TM, Ickes B, Albeck D, Soderstrom S, Granholm AC, Mohammed AH (1999). Changes in brain nerve growth factor levels and nerve growth factor receptors in rats exposed to environmental enrichment for one year. *Neuroscience* 94, 279-286.
- Pizzi WJ, Barnhart JE (1976). Effects of monosodium glutamate on somatic development, obesity and activity in the mouse. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 5, 551-557.
- Poon TK, Cameron DP (1978). Measurement of oxygen consumption and locomotor activity in monosodium glutamate-induced obesity. *Am. J. Physiol.* 234, E532-534.
- Przywara DA, Kulkarni JS, Wakade TD, Leontiev DV, Wakade AR (1998). Pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide and nerve growth factor use proteasome to rescue nerve growth factor-deprived sympathetic neurons cultured from chick embryos. *J. Neurochem.* 71, 1889-1897.
- Puig de Parada M, Parada MA, Hernandez L (1995). Dipsogenic effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP38) injected into the lateral hypothalamus. *Brain Res.* 696, 254-257.
- Reddy GR, Suresh A, Murthy KS, Chetty CS (2002). Lead neurotoxicity: heme oxygenase and nitric oxide synthase activities in developing rat brain. *Neurotox. Res.* 4, 33-39.
- Reglódi D, Kiss P, Tamás A, Lengvári I (2003). The effects of PACAP and PACAP antagonist on the neurobehavioral development of newborn rats. *Behav. Brain Res.* 140, 131-139.
- Reglódi D, Somogyvári-Vigh A, Vigh S, Kozicz T, Arimura A (2000). Delayed systemic administration of PACAP38 is neuroprotective in transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke* 31, 1411-1417.
- Reglódi D, Tamás A, Lengvári I (2003). Examination of sensorimotor performance following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res. Bull.* 59, 459-466.

- Reglódi D, Tamás A, Somogyvári-Vigh A, Szántó Z, Kertes E, Lénárd L, Arimura A, Lengvári I (2002). Effects of pretreatment with PACAP on the infarct size and functional outcome in rat permanent focal cerebral ischemia. *Peptides* 23, 2227-2234.
- Reglódi D, Somogyvári-Vigh A, Vigh S, Maderdrut JL, Arimura A (2000). Neuroprotective effects of PACAP38 in a rat model of transient focal ischemia under various experimental conditions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 921, 119-128.
- Reinoso BS, Castro AJ (1989). A study of corticospinal remodelling using retrograde fluorescent tracers in rats. *Exp. Brain Res.* 74, 387-394.
- Roberto M, Brunelli M (2000). PACAP-38 enhances excitatory synaptic transmission in the rat hippocampal CA1 region. *Learning Memory* 7, 303-311.
- Rogers DC, Campbell CA, Stretton JL, Mackay KB (1997). Correlation between motor impairment and infarct volume after permanent and transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke* 28, 2060-2066.
- Roth KA, Katz RJ (1979). Stress, behavioral arousal, and open-field activity – a reexamination of emotionality in the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 3, 247-263.
- Saari MJ, Fong S, Shivji A, Armstrong JN (1990). Enriched housing masks deficits in place navigation induced by neonatal monosodium glutamate. *Neurotoxicol. Teratol.* 12, 29-32.
- Sachetti B, Lorenzini CA, Baldi E, Bucherelli C, Roberto M, Tassoni G, Brunelli M (2001). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide hormone (PACAP) at very low dosages improves memory in the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* 76, 1-6.
- Sale A, Cenni MC, Ciucci F, Putignano E, Chierzi S, Maffei L (2007). Maternal enrichment during pregnancy accelerates retinal development of the fetus. *PLoS ONE.* 2, e1160.
- Sanchis-Segura C, Aragon CM (2002). Consequences of monosodium glutamate or goldthioglucose arcuate nucleus lesions on ethanol-induced locomotion. *Drug Alcohol Depend.* 68, 189-194.
- Schmidt WJ, Beninger RJ (2006). Behavioral sensitization in addiction, schizophrenia, Parkinson's disease and dyskinesia. *Neurotox. Res.* 10, 161-166.



- Schneider JS, Lee MH, Anderson DW, Zuck L, Lidsky TI (2001). Enriched environment during development is protective against lead-induced neurotoxicity. *Brain Res.* 896, 48-55.
- Schneider T, Turczak J, Przewlocki R (2006). Environmental enrichment reverses behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: issues for a therapeutic approach in autism. *Neuropsychopharmacology* 31, 36-46.
- Schoelch C, Hubschle T, Schmidt I, Nuesslein-Hildesheim B (2002). MSG lesions decrease body mass of suckling-age rats by attenuating circadian decreases of energy expenditure. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283, E604-611.
- Segovia G, Yague AG, Garcia-Verdugo JM, Mora F (2006). Environmental enrichment promotes neurogenesis and changes the extracellular concentrations of glutamate and GABA in the hippocampus of aged rats. *Brain Res. Bull.* 70, 8-14.
- Segura-Aguilar J, Kostrzewa RM (2004). Neurotoxins and neurotoxic species implicated in neurodegeneration. *Neurotox. Res.* 6, 615-630.
- Seress L (1982). Divergent effects of acute and chronic monosodium glutamate treatment on the anterior and posterior parts of the arcuate nucleus. *Neuroscience* 7, 2207-2216.
- Seress L, Lazar G, Kosaras B, Robertson RT (1984). Regional effect of monosodium-L-glutamate on the superficial layers of superior colliculus in rat. *Cell Tissue Res.* 235, 453-457.
- Sherwood NM, Krueckl SL, McRory JE (2000). The origin and function of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocrine Rev.* 21, 619-670.
- Sheward WJ, Lutz EM, Copp AJ, Harmar AJ (1998). Expression of PACAP, and PACAP type 1 (PAC1) receptor mRNA during development of the mouse embryo. *Dev. Brain Res.* 109, 245-53.
- Shin DH, Lee E, Kim JW, Kwon BS, Jung MK, Jee YH, Kim J, Bae S, Chang YP (2004). Protective effect of growth hormone on neuronal apoptosis after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *Neurosci. Lett.* 354, 64-68.
- Sisk DR, Kuwabara T, Kirsch AD (1984). Behavioral recovery in albino rats with glutamate-damaged retinas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 25, 1124-1128.

- Skoglosa Y, Takei N, Lindholm D (1999). Distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide mRNA in the developing rat brain. *Molec. Brain Res.* 65, 1-13.
- Smart JL, Dobbing J (1971a). Vulnerability of developing brain II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development on behavior in the rat. *Brain Res.* 28, 85-95.
- Smart JL, Dobbing J (1971b). Vulnerability of developing brain VI. Relative effects of foetal and early postnatal undernutrition on reflex ontogeny and development of behavior in the rat. *Brain Res.* 33, 303-314.
- Somogyvári-Vigh A, Reglődi D (2004). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: a potential neuroprotective peptide. *Curr. Pharm. Des.* 10:2861-2889.
- Squibb RE, Tilson HA, Meyer OA, Lamartiniere CA (1981). Neonatal exposure to monosodium glutamate alters the neurobehavioral performance of adult rats. *Neurotoxicology* 2, 471-484.
- Stansfield KH, Philpot RM, Kirstein CL (2004). The animal model of sensation seeking: the adolescent rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1021, 453-458.
- Stricker-Krongrad A, Burlet C, Beck B (1998). Behavioral deficits in monosodium glutamate rats: specific changes in the structure of feeding behavior. *Life Sci.* 62, 2127-2132.
- Stricker-Krongrad A, Beck B (2004). Up-regulation of neuropeptide Y receptors in the hypothalamus of monosodium glutamate-lesioned Sprague-Dawley rats. *Nutr. Neurosci.* 7, 241-245.
- Sung KJ, Chang SE, Paik EM, Lee MW, Choi JH (1999). Vasoactive intestinal polypeptide stimulates the proliferation of HaCaT cell via TGF- $\alpha$ . *Neuropeptides* 33, 435-446.
- Tabuchi A, Koizumi M, Nakatsubo J, Yaguchi T, Tsuda M (2001). Involvement of endogenous PACAP expression in the activity-dependent survival of mouse cerebellar granule cells. *Neurosci. Res.* 39, 85-93.
- Tamás A, Reglődi D, Szántó Z, Borsiczky B, Németh J, Lengvári I (2002). Comparative neuroprotective effects of preischemic PACAP and VIP administration in

- permanent occlusion of the middle cerebral artery in rats. *Neuroendocrinol. Lett.* 23, 249-254.
- Tamás A, Gábel R, Racz B, Dénes V, Kiss P, Lubics A, Lengvári I, Reglódi D (2004). Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in retinal degeneration induced by monosodium-glutamate. *Neurosci. Lett.* 372, 110-113.
- Tanaka J, Koshimura K, Murakami Y, Sohmiya M, Yanaihara N, Kato Y (1997). Neuronal protection from apoptosis by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *Regul. Peptides* 72, 1-8.
- Telegdy G, Kokavszky K (2000). The action of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on passive avoidance learning. The role of neurotransmitters. *Brain Res.* 874, 194-199.
- Ten VS, Bradley-Moore M, Gingrich JA, Stark RI, Pinsky DJ (2003). Brain injury and neurofunctional deficit in neonatal mice with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Behav. Brain Res.* 145, 209-219.
- Tomimatsu T, Fukuda H, Endoh M, Mu J, Watanabe N, Kohzuki M, Fujii E, Kanzaki T, Oshima K, Doi K, Kubo T, Murata Y (2002). Effects of neonatal hypoxia-ischemic brain injury on skilled motor tasks and brainstem function in adult rats. *Brain Res.* 926, 108-117.
- Towfighi J, Houeman C, Vannucci RC, Heitjan DF (1994). Effect of unilateral perinatal hypoxic-ischemic brain damage on the gross development of opposite cerebral hemisphere. *Biol. Neonate* 65, 108-118.
- Uchida D, Arimura A, Somogyvári-Vigh A, Shioda S, Banks WA (1996). Prevention of ischemia-induced death of hippocampal neurons by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *Brain Res* 736, 280-286.
- Urena-Guerrero ME, Lopez-Perez SJ, Beas-Zarate C (2003). Neonatal monosodium glutamate treatment modifies glutamic acid decarboxylase activity during rat brain postnatal development. *Neurochem. Int.* 42, 269-276.
- van der Harts JE, Baars AM, Spruijt BM (2003). Standard housed rats are more sensitive to rewards than enriched housed rats as reflected by their anticipatory behaviour. *Behav. Brain Res.* 142, 151-156.

- van der Staay FJ, Augstein KH, Horváth E (1996). Sensorimotor impairments in Wistar Kyoto rats with cerebral infarction, induced by unilateral occlusion of the middle cerebral artery: recovery of function. *Brain Res.* 715, 180-188.
- van Rijn CM, Marani E, Rietveld WJ (1986). The neurotoxic effect of monosodium glutamate (MSG) on the retinal ganglion cells of the albino rat. *Histol. Histopathol.* 1, 291-295.
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Fournier A, Vaudry H (1999). Neurotrophic activity of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on rat cerebellar cortex during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 9415-9420.
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Pamantung TF, Fontaine M, Fournier A (2000). The neuroprotective effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on cerebellar granule cells is mediated through inhibition of the CED3-related cystein protease caspase-3/ CPP32. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13390-13395.
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H (2000). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol. Rev.* 52, 269-324.
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Pamantung TF, Fournier A, Vaudry H (2000). PACAP acts as a neurotrophic factor during histogenesis of the rat cerebellar cortex. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 921, 293-299.
- Wagner BP, Nedelcu J, Martin E (2002). Delayed postischemic hypothermia improves long-term behavioral outcome after cerebral hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Pediatr. Res.* 51, 354-360.
- Wallace DR, Dawson R Jr (1990). Effect of age and monosodium-L-glutamate (MSG) treatment on neurotransmitter content in brain regions from male Fischer-344 rats. *Neurochem. Res.* 15, 889-898.
- Wang LS, Zhou J, Shao XM, Tang XC (2002). Huperzine A attenuates cognitive deficits and brain injury in neonatal rats after hypoxia-ischemia. *Brain Res.* 949, 162-170.
- Waschek JA, Casillas RA, Nguyen TB, DiCicco-Bloom EM, Carpenter EM, Rodriguez WI (1998). Neural tube expression of pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) and receptor: potential role in patterning and neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 9602-9607.

- Waschek JA, Lelievre V, Bravo DT, Nguyen T, Muller JM (1997). Retinoic acid regulation of the VIP and PACAP autocrine ligand and receptor system in human neuroblastoma cell lines. *Peptides* 18, 835-841.
- Zelena D, Jezova D, Ács Z, Makara GB (1998). Monosodium glutamate lesions inhibit the N-methyl-D-aspartate-induced growth hormone but not prolactin release in rats. *Life Sci.* 62, 2065-2072.
- Zheng XG, Tan BP, Luo XJ, Xu W, Yang XY, Sui N (2004). Novelty-seeking behavior and stress-induced locomotion in rats of juvenile period differentially related to morphine place conditioning in their adulthood. *Behav. Processes* 65, 15-23.
- Zupan V, Hill JM, Brenneman DE, Gozes I, Fridkin M, Robberecht P, Evrard P, Gressens P (1998). Involvement of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide II, vasoactive intestinal peptide 2 receptor in mouse neocortical astrocytogenesis. *J. Neurochem.* 70, 2165-2173.

## **Jelen PhD dolgozat alapjául szolgáló közlemények:**

- Kiss P**, Hauser D, Tamás A, Lubics A, Rácz B, Horváth Zs, Farkas J, Zimmermann F, Stepien A, Lengvári I, Reglődi D (2007). Changes in open-field activity and novelty-seeking behavior in periadolescent rats neonatally treated with monosodium glutamate. *Neurotox. Res.* 12, 85-93. (IF: 5.234).
- Kiss P**, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Szalai M, Hauser D, Horváth Zs, Rácz B, Gábel R, Babai N, Tóth G, Reglődi D (2006). Effects of systemic PACAP treatment in monosodium glutamate-induced behavioral changes and retinal degeneration. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1070, 365-370. (IF: 1,971)
- Kiss P**, Tamás A, Lubics A, Szalai M, Szalontay L, Lengvári I, Reglődi D (2005). Development of neurological reflexes and motor coordination in rats neonatally treated with monosodium glutamate. *Neurotox. Res.* 8, 235-244. (IF: 1,664)
- Lubics A, Reglődi D, Tamás A, **Kiss P**, Szalai M, Szalontay L, Lengvári I (2005). Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic/ischemic injury. *Behav. Brain Res.* 157, 157-165. (IF: 2,865)
- Reglődi D, **Kiss P**, Tamás A, Lengvári I (2003). The effects of PACAP and PACAP antagonist on the neurobehavioral development of newborn rats. *Behav. Brain Res.* 140, 131-139. (IF: 2,817)

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények összes impact faktora: 14,551

## **Egyéb közlemények:**

- Somogyi I, Boros A, Engelmann P, Nemeth J, Lubics A, Tamás A, **Kiss P**, Reglődi D, Pollák E, Molnár L. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-like compounds could modulate the activity of coelomocytes in earthworm. *Ann NY Acad Sci* in press (IF: 1.731).
- Atlasz T, Szabadfi K, Reglődi D, **Kiss P**, Tamás A, Tóth G, Molnár A, Szabó K, Gábel R. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP1-38) and

- its fragments on retinal degeneration induced by neonatal MSG treatment. *Ann NY Acad Sci* in press (IF: 1.731).
- Boronkai A, Brubel R, Racz B, Tamas A, **Kiss P**, Horvath G, Lubics A, Szigeti A, Bellyei Sz, Toth G, Lakatos A, Reglodi D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on the survival and signal transduction pathways in human choriocarcinoma cells. *Ann NY Acad Sci* in press (IF: 1.731).
- Roth E, Weber G, **Kiss P**, Horvath G, Toth G, Gasz B, Ferencz A, Gallyas F, Reglodi D, Racz B. Effects of PACAP and preconditioning against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis in vitro. *Ann NY Acad Sci* in press (IF: 1.731).
- Varhalmi E, Somogyi I, Kiszler G, Nemeth J, Reglodi D, Lubics A, **Kiss P**, Tamas A, Pollak E, Molnar L. Expression of PACAP-like compounds during the caudal regeneration of the earthworm *Eisenia fetida*. *J Mol Neurosci* in press (IF: 1.735).
- Racz B, Horvath G, Faluhelyi N, Nagy AD, Tamas A, **Kiss P**, Gallyas F, Toth G, Gaszner B, Csernus V, Reglodi D. Effects of PACAP on the circadian changes of signaling pathways in chicken pinealocytes. *J Mol Neurosci* in press (IF: 1.735).
- Boros A, Reglodi D, Herbert Z, Kiszler G, Nemeth J, Lubics A, **Kiss P**, Tamas A, Shioda S, Matsuda K, Pollak E, Molnar L. Changes in the expression of PACAP-like compounds during the embryonic development of the earthworm *Eisenia fetida*. *J Mol Neurosci* in press (IF: 1.735).
- Hernadi L, Pirger Zs, Kiss T, Nemeth J, Mark L, **Kiss P**, Tamas A, Lubics A, Toth G, Shioda S, Reglodi D. The presence and distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptor (PAC1-R) in the snail *Helix pomatia*. *Neuroscience* 2008;155:387-402 (IF: 3.352).
- Reglodi D, Borzsei R, Bagoly T, Boronkai A, Racz B, Tamas A, **Kiss P**, Horvath G, Brubel R, Nemeth J, Toth G, Helyes Z. Agonistic behavior of PACAP6-38 on sensory nerve terminals and cytotrophoblast cells. *J Mol Neurosci* in press (IF: 1.735)
- Pirger Zs, Nemeth J, Hiripi L, Toth G, **Kiss P**, Lubics A, Tamas A, Hernadi L, Kiss T, Reglodi D. PACAP has anti-apoptotic effect in the salivary gland of an invertebrate species, *Helix pomatia*. *J Mol Neurosci* in press (IF: 1.735)

- Gaál V, Márk L, **Kiss P**, Kustos I, Tamás A, Kocsis B, Lubics A, Németh V, Németh A, Lujber L, Pytel J, Tóth G, Reglődi D. Investigation of the effects of PACAP on the composition of tear and endolymph proteins. *J Mol Neurosci* 2008 in press (IF: 1.735)
- Szakály P, **Kiss P**, Lubics A, Magyarlaki T, Tamás A, Rácz B, Lengvári I, Tóth G, Reglődi D. Effects of PACAP on survival and renal morphology in rats subjected to renal ischemia-reperfusion. *J Mol Neurosci* 2008 in press (IF: 1.735).
- Atlasz T, Szabadfi K, **Kiss P**, Babai N, Kőszegi Z, Tamás A, Reglődi D, Gábrriel R. PACAP-mediated neuroprotection of neurochemically identified cell types in MSG-induced retinal regeneration. *J Mol Neurosci* in press (IF: 1.735)
- Rácz B, Gasz B, Gallyas F Jr., **Kiss P**, Tamás A, Józsa R, Lubics A, Lengvári I, Tóth G, Hegyi O, Róth E, Reglődi D. PKA-Bad-14-3-3 and Akt-Bad-14-3-3 signaling pathways are involved in the protective effects of PACAP against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis. *Regul Pept* 2008; 145: 105-115. (IF: 2,422).
- Atlasz T, Babai N, Reglődi D, **Kiss P**, Tamás A, Bari F, Domoki F, Gábrriel R. Diazoxide is protective in the rat retina against ischemic injury induced by bilateral carotid occlusion and glutamate-induced degeneration. *Neurotox Res* 2007; 12: 105-111. (IF: 5.234)
- Rácz B, Gallyas F Jr, **Kiss P**, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Róth E, Tóth G, Hegyi O, Verzár Zs, Fabricsek Cs, Reglődi D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on the PKA-Bad-14-3-3 signaling pathway in glutamate-induced retinal injury in neonatal rats. *Neurotox Res* 2007; 12: 95-104.(IF: 5.234)
- Kiss P**, Reglődi D, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Józsa R, Somogyvári-Vigh A, Szilvássy Z, Németh J. Changes of PACAP levels in the brain show gender differences following short-term water and food deprivation. *Gen Comp Endocrinol* 2007; 152: 225-230. (IF: 2.562).
- Atlasz T, Babai N, **Kiss P**, Reglődi D, Tamás A, Szabadfi K, Tóth G, Hegyi O, Lubics A, Gábrriel R. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is protective in



- bilateral carotid occlusion-induced retinal lesion in rats. *Gen Comp Endocrinol* 2007; 153: 108-114. (IF: 2,562)
- Rácz B, Gasz B, Borsiczky B, Gallyas F Jr, Tamás A, Józsa R, Lubics A, **Kiss P**, Róth E, Ferencz A, Tóth G, Hegyi O, Wittmann I, Lengvári I, Somogyvári-Vigh A, Reglődi D. Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in endothelial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Gen Comp Endocrinol* 2007; 153: 115-123. (IF: 2,562)
- Németh J, Jakab B, Józsa R, Hollósy T, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, **Kiss P**, Oberitter Zs, Horváth B, Szilvássy Z, Reglődi D. PACAP-27 radioimmunoassay: Description and application of a novel method. *J Radioanal Nucl Chem* 2007; 273: 327-332. (IF: 0,499).
- Rácz B, Reglődi D, **Kiss P**, Babai N, Atlasz T, Gábrriel R, Lubics A, Gallyas F Jr, Gasz B, Tóth G, Róth E, Hegyi O, Lengvári I, Tamás A. In vivo neuroprotection by PACAP in excitotoxic retinal injury: review of effects on retinal morphology and apoptotic signal transduction. *Int J Neuroprot Neurodeg* 2006; 2: 80-85
- Reglődi D, Lubics A, **Kiss P**, Lengvári I, Gaszner B, Tóth G, Hegyi O, Tamás A. Effect of PACAP in 6-OHDA-induced injury of the substantia nigra in intact young and ovariectomized female rats. *Neuropeptides* 2006; 40: 265-274. (IF: 2,155)
- Rácz B, Tamás A, **Kiss P**, Tóth G, Gasz B, Borsiczky B, Ferencz A, Gallyas F Jr, Róth E, Reglődi D. Involvement of ERK and CREB signalling pathways in the protective effect of PACAP on monosodium glutamate-induced retinal lesion. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1070: 507-511. (IF: 1,971)
- Babai N, Atlasz T, Tamás A, Reglődi D, Tóth G, **Kiss P**, Gábrriel R. Search for the optimal monosodium glutamate treatment schedule to study the neuroprotective effects of PACAP in the retina. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1070: 149-155. (IF: 1,971)
- Babai N, Atlasz T, Tamás A, Reglődi D, **Kiss P**, Gábrriel R. Degree of damage compensation by various PACAP treatments in monosodium glutamate-induced retina degeneration. *Neurotox Res* 2005; 8: 227-233. (IF: 1,664)
- Tamás A, Gábrriel R, Rácz B, Dénes V, **Kiss P**, Lubics A, Lengvári I, Reglődi D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in retinal degeneration

induced by monosodium-glutamate. *Neurosci Lett* 2004; 372: 110-113. (IF: 2,019)

Tudományos közlemények összesített impact faktora (absztraktok nélkül): 71,529

**Folyóiratban megjelent idézhető absztraktok:**

Reglódi D., **Kiss P.**, Tamás A., Farkas B., Lengvári I.: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) enhances neurobehavioral development in newborn rats. - *Clin. Neurosci./Ideggy. Szle.* 56. 74. 2003.

Lubics A., Reglódi D., Tamás A., Szalontay L., **Kiss P.**, Szalai M., Lengvári I.: Behavioral effects of neonatal hypoxic-ischemic injury during the first six postnatal weeks. - *Clin Neurosci/Ideggy Szle* 57. Suppl. 1: 42. 2004.

Reglódi D., Tamás A., Rác B., Dénes V., **Kiss P.**, Lengvári I., Gábel R.: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects against monosodium-glutamate toxicity in the rat retina. - *Regul. Pept.* 122: 36. 2004.

Reglódi D., **Kiss P.**, Tamás A., Lubics A., Szalontay L., Szalai M., Lengvári I.: Effects of monosodium glutamate treatment on neurological reflex performance, motor coordination and open-field behavior in neonatal rats. - *Psychopharm. Biol. Narc.* 4(2-3): 753. 2004.

**Kiss P.**, Tamás A., Lubics A., Lengvári I., Szalai M., Hauser D., Horváth Zs., Reglódi D.: Effects of systemic PACAP treatment in monosodium glutamate-induced behavioral changes. - *Regul. Pept.* 130. 147. 2005.

Rác B., Tamás A., **Kiss P.**, Gasz B., Borsiczky B., Gallyas F Jr., Sümegi B., Tóth G., Róth E., Reglódi D.: Possible signalling pathways involved in the protective effect of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion. - *Regul. Pept.* 130. 174. 2005.

**Kiss P.**, Tamás A., Lubics A., Szalontay L., Szalai M., Lengvári I., Reglódi D.: Effects of monosodium glutamate treatment on the neurobehavioral development of newborn rats. - *Clin Neurosci/Ideggy. Szml.* 58(S1): 51. 2005.

- Rácz B., Tamás A., Dénes V., **Kiss P.**, Lengvári I., Gábrriel R., Reglődi D.: PACAP attenuates the monosodium-glutamate-induced retinal degeneration in the rat. - Clin Neurosci/Idegy. Szml. 58(S1): 78. 2005.
- Babai N, Atlasz T, Schaffer D, Reglődi D, Tamás A, **Kiss P**, Szalai M, Gábrriel R. Comparison of three different neurodegeneration models in the rat retina: monosodium glutamate (MSG), hypoxic insult combined with unilateral carotis occlusion and bilateral carotis occlusion. Clin Neurosci/Idegy. Szml. 2006; 59(S1): 8.
- Kiss P**, Tamás A, Lubics A, Lengvári I, Szalai M, Rácz B, Babai N, Gábrriel R, Reglődi D. Systemic PACAP administration attenuates monosodium glutamate-induced neurobehavioral changes. Clin Neurosci/Idegy. Szml. 2006; 59(S1): 34.
- Rácz B, Tamás A, **Kiss P**, Gasz B, Borsiczky B, Gallyas F Jr, Tóth G, Róth E, Reglődi D. Signaling pathways involved in the protective effects of PACAP in MSG-induced retinal degeneration. Clin Neurosci/Idegy. Szml. 2006; 59(S1): 54.
- Kiss P**, Nemeth J, Tamas A, Lubics A, Lengvari I, Jozsa R, Reglodi D. Changes in endogenous PACAP levels in the brain following food and water deprivation. Clin Neurosci/Idegy. Szml. 2007; 60(S1): 33.
- Racz B, Gallyas F, Gasz B, Tamas A, Lubics A, **Kiss P**, Roth E, Toth G, Lengvari I, Hegyi O, Wittmann I, Reglodi D. Effects of the neuropeptide PACAP on the survival of endothelial cells. Clin Neurosci/Idegy. Szml. 2007; 60(S1): 54.
- Reglodi D, **Kiss P**, Farkas J, Szalai M, Lubics A, Tamas A, Lengvari I, Szogyi D, Atlasz T, Babai N, Gabriel R, Koppan M. Effects of hypoxic/ischemic injuries on neurobehavioral development of newborn rats. Clin Neurosci/Idegy. Szml. 2007; 60(S1): 55.
- Babai N, Atlasz T, **Kiss P**, Gábrriel R, Bari F, Domoki F, Fekete É, Zorilla EP, Reglődi D. The effects of various neuroprotective compounds on different retina degeneration models. Clin Neurosci/Idegy. Szml. 2007; 60(S1): 6.
- Rácz B, Reglődi D, Tamás A, Lubics A, **Kiss P**, Gallyas Jr. F, Wittmann I, Fabricsek Cs, Tóth G, Hegyi O, Borsiczky B, Ferencz A, Wéber Gy, Róth E. A hipofizis adenilát cikláz aktiváló polipeptid hatása az endothél sejtek oxidatív stressz okozta apoptotikus sejthalálában. Folia Hepatologica. 2007; 11: 31-32.

## Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom mindenekelőtt Szüleimnek.

Középiskolai tanárainknak is köszönettel tartozom, nélkülük biztosan másképp alakult volna az életem.

A Pécsi Tudományegyetem számos dolgozójának tartozom köszönettel, akik tanulmányaim alatt, tudományos diákkörösként majd pedig munkatársként rengeteget segítettek.

Reglódi Dórának köszönöm, hogy a munkacsoportja tagja lehetek, az ő kimeríthetetlen energiája és lelkesedése mindenkit magával ragad.

Lubics Andreának, Tamás Andreának, Horváth Gabriellának és Rác Boglárkának köszönöm a sok támogatást, és hogy mindig lehet számítani a segítségükre.

Csernus Valér professzor úrnak köszönöm, hogy programvezetőként mindig támogatta munkámat.

Lengvári István tanár úrnak köszönöm a felejthetetlen anatómia és szövettan gyakorlatokat.

Az Anatómiai Intézet minden egyes munkatársának köszönöm, hogy az Intézet légköre mindig baráti és vidám.

Bár jelen dolgozat szorosabb témájába nem tartozik, szeretném megköszönni Gáriel Róbert professzor úrnak és munkacsoportja tagjainak, Atlasz Tamásnak, Babai Norbertnek és Szabadfi Krisztinának a retina szövettani kísérletekben a kollaborációt.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm Tudományos Diákkörös hallgatóink, Szalai Milán, Hauser Diána, Farkas József és Horváth Gábor szorgalmas munkáját.