

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**A TENASCIN-R ÉS BREVICAN SZEREPE AZ  
EGYENSÚLYOZÓ RENDSZER SÉRÜLÉSÉT KÖVETŐ  
KOMPENZÁCIÓS FOLYAMATOKBAN**

**Dr. Magyar Ágnes**

**Témavezető: Dr. Gaál Botond**



**DEBRECENI EGYETEM  
Fogorvostudományi Doktori Iskola**

**Debrecen, 2024**

# **A TENASCIN-R ÉS BREVICAN SZEREPE AZ EGYENSÚLYOZÓ RENDSZER SÉRÜLÉSÉT KÖVETŐ KOMPENZÁCIÓS FOLYAMATOKBAN**

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

**Írta:** Dr. Magyar Ágnes okleveles általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Fogorvostudományi Doktori Iskolája keretében

**Témavezető:** Dr. Gaál Botond, MSc, PhD

## **Az értekezés bírálói:**

Dr. Kozák Norbert, PhD

Dr. Tamás Andrea, PhD

## **A bírálóbizottság:**

**elnök:** Prof. Dr. Nánási Péter, az MTA doktora

**tagok:** Dr. Kozák Norbert, PhD

Dr. Tamás Andrea, PhD

Dr. Szentandrassy Norbert, PhD

Dr. Szalai Eszter, PhD

## **Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:**

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet 'A' épület tanterme.

Ideje: 2025.január 23. 13:00

## A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI

---

A központi idegrendszeri (KIR) neuronhálózatok reorganizációjában számos fiziológiai és pathofiziológiai hatás játszik szerepet. E komplex folyamat intra- és extracelluláris események egymást feltételező sorozata, melyben, laborunk munkatársai és más kutatók megfigyelései szerint, az extracelluláris matrix (ECM) is meghatározó szereplő, s alapvetően hozzájárul az adott neuronhálózat új egyensúly szerinti működéséhez. Szintén az elmúlt évtizedben ismerték fel, hogy az ECM átépülése nem tekinthető egységesnek a KIR számos morfológiailag, így funkcionálisan is eltérő részein, ill. a kiváltó ok is nagyon meghatározó. A KIR direkt sérülései után a károsodott funkció visszatérésének mértéke és lehetősége különböző tényezők függvénye. Ismert, hogy az embrionális idegszövet nagyfokú plaszticitással rendelkezik, a születés után azonban ez a képessége fokozatosan beszűkül (Carulli és mtsai., 2006; Galtrey és mtsai., 2008). Az egyre szaporodó kísérleti adatok ellenére a KIR sérülését követő regenerációs és plaszticitási folyamatok háttérben feltételezett morfológiát és funkcionalitást, sejtfelszíni receptor expressziót, neurotranszmitter termelődést megváltoztató folyamatok molekuláris mechanizmusa ma még csak részben ismert (Oohashi és mtsai., 2015).

Az egyensúlyozó érzékszerv receptorait magába foglaló belsőfül kiirtásával egyoldali vestibularis laesiot lehet előidézni. A vestibularis deafferentáció dinamikus és statikus tünetekben nyilvánul meg: testtartási és szemmozgási zavarokat eredményez, spontán nystagmussal jár és az izomtónus aszimmetrikussá válik, amelyekhez a vegetatív idegrendszer kóros működése is társul (hányás, szédülés). Történik mindez úgy, hogy a vestibularis rendszer a laesiot követően emlősökben nem regenerálódik, valamint a primer afferens vestibularis rostok egykori synapticus aktivitása a neuronhálózat számára valószínűleg elvesznek. Az elnémuló primer afferensek ellenében viszont a vestibularis magokban végződő somatosensoros, látórendszeri és kisagyi afferensek, valamint vestibularis commissuralis idegrostok működése megmarad. Kísérletes adatok bizonyítják, hogy a vestibularis laesio után kialakult

tünetek normalizálódása már az axonális sprouting megindulása előtt megkezdődik, ami arra utal, hogy a neuronhálózatok szintjén egy synapticus reorganizáció történik (Deák és mtsai., 2012; Gaál és mtsai., 2015; Faralli és mtsai., 2016).

## **A vestibularis rendszer agytörzsi apparátusa**

Az egyensúlyzó rendszer érzékszerveit a sziklacsont belső fül labirinthusa tartalmazza. A csontos köpenyen belül, annak alakját követve, fut a hártás labirintus. Ennek falában található a lineáris- és szöggyorsulás érzékszerveit, az ún. szőrsejteket. Szöggyorsulást a három félkörös ívjárat ampulláinak *crista ampullaris*-ai, míg lineáris gyorsulást az *utriculus* és *sacculus* maculái érzékelik (Paxinos és Watson 1998). A *ganglion vestibulare* (Scarpa) bipoláris neuronjainak perifériás nyúlványai synaptizálnak a szőrsejtekkel, centrális axonjai pedig az agytörzsi vestibularis magkomplexben végződnek. A Scarpa ganglionból egységes kötegben lép ki a *nervus vestibularis* s fut az agytörzsbe, a híd-nyúlvelő szöglet ventralis felszínén, közvetlenül a *pedunculus cerebellaris inferior* alatt.

A patkány vestibularis magkomplexuma négy magból áll a nyúlvelő nyílt részének dorsolaterális területén. Leleteink feldolgozása során a Suarez és mtsai. 1993 által közölt morfológiai leírást vettük alapul, az alábbi alapértékeket kiemelve.

**1. A nucleus vestibularis superior (NVS) (Bechterew)** Átlagos rostro-caudalis hossza  $0,72 \pm 0,16$  mm. A sejtek 25 %-a kisméretű,  $20 \mu\text{m}$ -nél kisebb átmérővel rendelkezik. A sejtek 64%-a közepes méretű ( $20\text{-}35 \mu\text{m}$ ), és 6 %-ban található nagyméretű neuron ( $>35 \mu\text{m}$ ). A sejtmag rostralis és caudalis részének neuron átmérő megoszlása hasonló. A mag rostralis és caudalis részének neuron átmérő megoszlása hasonló.

A NVS közepes- és nagyméretű neuronjait borító perineuronális hálók mutatták a legintenzívebb ECM halmozást a laborunkban elvégzett szemikvantitatív és optikai denzitás mérés alapján (Rácz és mtsai., 2014).

**2. A nucleus vestibularis medialis (NVM)** (Schwalbe) A legnagyobb rostro-caudalis kiterjedésű mag,  $1,58 \pm 0,21$  mm hosszban. A sejtek 53,5 %-a kisméretű,  $20 \mu\text{m}$ -nél kisebb átmérővel rendelkezik. A sejtek 45,5 %-a közepes méretű ( $20\text{-}35 \mu\text{m}$  közötti átmérő), és a 2%-ban található nagyméretű neuronok ( $>35\mu\text{m}$ ). A centralis és rostralisán a magnocellularis területen elhelyezkedő közepes méretű neuronok és a főként perifériásan elhelyezkedő parvocellularis régió kisméretű sejtjei eltérő funkcióval rendelkeznek (Johnston és mtsai., 1993; Saito és mtsai., 2008; Takazawa és mtsai., 2004).

Több leírás, ill. laborunk saját felismerése (Rác és mtsai., 2014) arra is rámutatnak, hogy a NVM nagyméretű neuronjait fedi perineuronális háló, ill. bizonyos parvoceullularis populációt is.

**3. A nucleus vestibularis lateralis (NVL)** (Deiters) Az NVL-t alkotó neuroncsoport legnagyobb hossza  $0,85 \pm 0,16$  mm (Suárez és mtsai 1993). A magot alkotó neuronok 9 %-a kisméretű,  $20 \mu\text{m}$ -nél kisebb átmérővel rendelkezik. A sejtek 45,5 %-a közepes méretű ( $20\text{-}35 \mu\text{m}$ ), és 41 %-ban található nagyméretű ( $35\text{-}50 \mu\text{m}$ ) és óriás neuronok ( $>50 \mu\text{m}$ ). Az eltérő méretű neuronok az NVL-n belül nem különböznek el, mint a NVM esetében.

A perineuronális hálók (PNN) festődési különbségei itt is szembetűnők, jól festődő PNN csak a magnocellularis neuronok körül figyelhető meg (Rác és mtsai., 2014).

**4. A nucleus vestibularis descendens (NVD)** (Roller): A NVD hossza elmarad a NVM-től, átlagosan  $1,18 \pm 0,2$  mm, de a négy vestibularis mag közül ez a legcaudalisabb elhelyezkedésű. A magot alkotó neuronok 26 %-a kisméretű,  $20 \mu\text{m}$ -nél kisebb átmérővel rendelkezik. A sejtek 62 %-a közepes méretű ( $20\text{-}35\mu\text{m}$ ), és 12%-ban található nagyméretű ( $35\text{-}50\mu\text{m}$ ) és óriás neuronok ( $>50\mu\text{m}$ ). A nagy és óriássejtek jellemzően a rostralis területen detektálhatóak, a közepes méretű sejtek hasonló arányban, míg a kisméretű sejtek főként a caudalis területen helyezkednek el (Suárez és mtsai.,1993).

A perineuronális hálók festődési intenzitása a rostrális területen erősebb, mint a caudalis régióban, mely valószínűleg összefüggésbe hozható a rostrális területen magasabb arányban előforduló nagyméretű sejtekkel és az eltérő efferenciációval (Rác és mtsai., 2014).

### **Extracellularis matrix a központi idegrendszerben**

A központi idegrendszer térfogatának hozzávetőleg 20%-át alkotja a sejtközi állomány, melynek tereiben az extracellularis mátrix (ECM) térhálózata van jelen (Nicholson és Syková, 1998). Az ECM a sejtek helyzetét stabilizálja, valamint cytokinek, neurohormonok, növekedési faktorok forgalmát, és az extracellularis tér ion egyensúlyát optimalizálja

Az idegszöveti matrixot a következő makromolekulák építik fel: **I.**

**hyaluronsav (HA); II. chondroitin-sulfat proteoglycan-ok (CSPG); III. glycoproteinek; és IV. kötőfehérjék** (link protein)

Az idegrendszeren kívül eső szövetek ECM-ában gyakori kollagén típusok a KIR-ben nem fordul elő. A hyaluronsavat, a kötőfehérjéket és az aggregant kizárólag a neuronok szintetizálják, a többi ECM-molekula előállításában az oligodendroglia és az astrocyták is részt vesznek (Carulli és mtsai. 2006, Lander és mtsai., 1998).

### ***Hyaluronsav az extracellularis matrixban***

A hyaluronsav (HA) D-glükuronsav és N-acetil-D-glükózamin dimerekből, váltakozó  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) és  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) glycozidos kötésekkel felépülő polimer óriásmolekula. A diszacharid monomerek száma 2000 és 25 000 közötti, a teljes lánc hosszúsága pedig 2–25  $\mu$ m-re tehető (Necas és mtsai., 2008). A hyaluronsav további szerkezeti jellemzői a nagy molekulatömegén túl, a nem szulfatált, ám karboxilált (COO<sup>-</sup>) kettős spirális konformáció, mely elágazásmentes (Toole, 2004).

A hyaluronsav szöveti szintjeit vestibularis laesióban jelen kutatás nem vizsgálta.

### ***Proteoglikánok az extracellularis matrixban***

Nagy molekulatömegű makromolekulák. Tengelyüket a jellegzetesen hosszú core protein alkotja, azokhoz pedig az eltérő hosszúságú és számú glükózaminoglikán oldalláncok (GAG) csatlakoznak (4.ábra). A GAG láncok ismétlődő diszacharidokból álló lineáris polimerek, a diszacharid monomereket egy uronsav és egy N-acetil glükózamin, vagy N-acetil galaktózamin alkotja.

A proteoglycanok jelenléte és működése a KIR-ben komplex, számos normális és kóros folyamatban kulcsszerepet játszanak. Emiatt potenciális célpontokká válnak az idegrendszeri betegségek kutatásában (Köwitsch és mtsai.,2018.).

A vestibularis kompenzáció vizsgálata mellett további humán vonatkozású brevican vizsgálatok zajlanak: a brevican gliomában, a tumorgenezisben betöltött szerepét illetően (Jaworski és mtsai., 1996); az Alzheimer kór molekuláris hátterét kezdeményező vizsgálatokban (Morawski és mtsai., 2011); és a direkt KIR sérülést követő regenerációs folyamatokban betöltött szerepe miatt (Jones és mtsai., 2003).

### ***Chondroitin sulphat proteoglikánok (CSPG)***

A hyaluronsav-kötő CSPG-ok, az ún. lecticanok csoportjába négy óriásmolekula sorolható: *aggrecan*, *versican*, *neurocan* és ***brevican***.

**Jelen értekezés a Brevicant vizsgálta, így a részletes leírás erre a molekulára összpontosít.**

**Aggrecan** Az aggrecan HA-val összekapcsolódva óriási, 200 MDa-nál is nagyobb térbeli hálózatot épít fel. Az aggrecan mind a perineuronális hálóban (PNN) mind pedig a neuropilben kimutatható. Laborunk korábbi megfigyelései szerint patkányok vestibularis neuronjainak PNN-iban az aggrecan a legnagyobb mennyiségben jelenlévő CSPG (Rácz és mtsai, 2014).

**Versican** A GAG oldalláncok lokalizációja és a tengelyfehérje hossza alapján, ill. a fejlődési stádium figyelembevételével négy izotípust különböztetnek meg: a V0, a V1, a V2 és a V3 (Zimmermann és Ruoslahti, 1989). A kifejlett KIR-ben a V2 izoformáját expresszálják oligodendrocyták. Jelenléte immunhisztokémiai

jelölésben pontszerű, mely a PNN területén valamint a Ranvier-féle befűződésekben is felismerhető.

**Neurocan** A tengelyfehérjén 7 db szulfatált GAG megkötésére alkalmas terület van (Iozzo és Schaefer, 2015). Molekulatömege 245 kDa. Csak a KIR-ben van jelen, ahol gátolja a neuritok *in vitro* növekedését kifejllett korban.

**Brevican** Az aggrecan mellett a brevican igen domináns jelenléte jellemzi a neuropilt, PNN-kat és perisynapticus tereket (Bruckner és mtsai., 2008; Frischknecht és Seidenbecher, 2012). Laborunk (Rác és mtsai 2014) leírása alapján magas expressziója jellemzi a patkány vestibularis magkomplexumának három magját (NVS, NVM, NVL), e magokban dominánsan jelen lévő közepes ill. nagyméretű neuronok perineuronális hálót.

Újszülött patkányokban expressziója fokozatosan növekszik, és felnőtt egyedeknél éri el a platót (Seidenbecher és mtsai., 1998). A brevicant gliasejtek és neuronok is termelik (Seidenbecher és mtsai., 1998, Yamada és mtsai, 1994, John és mtsai., 2006).

Molekulatömege 140 kDa. A globuláris szerkezetű N-terminális doménje (G1) tud kapcsolódni a HA-hoz, ezen kívül tartalmaz egy immunglobulin szerű hurkot és két link protein szakaszt. A tengelyfehérje középső szakasza nem homogén, mindössze 1-5 számú chondroitin sulfat oldalláncot hordoz. A HA-tól távol eső C-terminális doménjén található egy EGF (epidermal growth factor) modul, lektin szerű modul, valamint egy complement regulátor protein, mely utóbbi rendelkezik TN-R kapcsolódási affinitással (Celio, 1998;). A brevican a neuronok közvetlen felszínén van, aggrecan után a legnagyobb mennyiségben megjelenő PNN alkotó. Perisynapticus jelenléte ismert, és a tudományos irodalom véleménye összevág abban, hogy non-permisszív hatású az axonok újránövekedéséhez a kifejllett KIR-ben (Frischknecht és Seidenbecher, 2012; Celio, 1998;).

## **Glikoproteinek az extracellularis matrixban**

Az központi idegrendszer extracelluláris matrixának bonyolult rácsos térszerkezetében a HA-CSPG aggregátumokat térhálósítják a TN-R glikoproteinek. A HA-CSPG kapcsolatot stabilizálja továbbá a glycoproteinhez sorolt ún. kötőfehérjék, vagy link proteinek.

A **tenascinok** lokalizációjuk alapján négy altípusba különíthetők el emlősben: a Tenascin-R (TN-R), Tenascin-C, a Tenascin-X, Tenascin-W (Chiquet-Ehrismann és Tucker, 2011). **Jelen értekezés a TN-R-t vizsgálta, így a részletes leírás erre a molekulára összpontosít.**

**Tenascin-R** Szerkezetében 4,5 EGF és 9 fibronectin III ismétlődik. Két splice variánsa létezik 160 és 180 kDa molekulatömegben alegységként. A TN-R homotrimer formában fordul elő az ECM-a.

A TN-R számos ECM molekulához, ill. sejtfelszíni ligandhoz kötődik. Említhetők integrinek, heparan sulfat proteoglycánok, sejtheadhéziós molekulák az immunglobulin szupercsaládból (contactin, axonin TAG-1, neurofascin). Más sejtfelszíni molekulák is affinitást mutatnak, pl. annexin II és a receptor tyrosine foszfatáz. Más ECM partnerekkel is összekapcsolódik a C-terminálisán elhelyezkedő fibrinogén-szerű doménnel, így az említett lektikánok G3 doménjén keresztül az aggrecannal, brevicannal és neurocannal (Jones és Jones, 2000; Jang és mtsai., 2020; Zimmermann és Dours-Zimmermann, 2008).

A tenascin-R és a tenascin-C molekulák jelentős szereppel bírnak a perineuronális háló végső elrendeződésének kialakításában. Ezt bizonyítják a tenascin-R knock-out egereken végzett vizsgálatok, amelyek során CSPG-ok abnormális aggregációját figyelték meg, valamint ezzel összefüggő migrációs zavarokat (Carulli és mtsai., 2006; Galtrey és Fawcett, 2007). A humán onkológiai kutatások során a KIR lokalizációjú tumorok tenascin-C expressziója bizonyos daganatok strómájában rossz prognózissal jár fokozott áttétképződés miatt (Chiquet-Ehrismann és Tucker, 2011).

## **Az ECM szerveződési formái a központi idegrendszerben**

- (1) A *membrana limitans gliae perivascularis*-hoz és *-externus*-hoz tartozó *membrana basalis* a KIR szövetei és a cerebrovascularis rendszer között teremt barriert.
- (2) Perineuronális háló (PNN) tipikusan a perikaryon körül szerveződő, igen sűrű ECM szövetek. Dendriteket, valamint az axonkúpot is éppúgy körülveszi, melyet több agytörzsi területen leírtak laborunk munkatársai (Rácz és mtsai., 2014; Ritok és mtsai., 2022). A PNN összetételének, funkciójának meghatározását számos egymástól független munkacsoport dokumentálta emlősökben, kétéltűekben és madarakban (Celio és mtsai.1998.; Matesz és mtsai. 2005.; Szigeti és mtsai., 2006.; Mészár és mtsai., 2008.; Balmer és mtsai. 2009; Morawski és mtsai.2012; Rácz és mtsai. 2014; Gaál és mtsai. 2014). Kialakulása erősen összefügg a neuronok méretével, funkciójával, melyek szorosan kapcsolódnak az adott neuron synapticus forgalmával. Immunhisztokémiai jelölése jól kiemeli a somát és nyúlványait, és élesen elkülöníthető a kevésbé denz neuropil matrix környezetétől. ECM összetételét tekintve kimutatható benne a hyaluronsav, többféle CSPG (aggrecan, brevican, neurocan, versican), tenascin-R és több link protein is (Celio és mtsai., 1998; Kwok és mtsai., 2011; Rácz és mtsai., 2014; Ritok és mtsai., 2022).
- (3) Az idegrendszeri interstitialis mátrix a neuropil réseiben kimutatható lazán rendezett ECM. Lamina basalis-szal és PNN-tel nem folytonos szorosan, attól morfológiailag, ill. mikroszkópos elemzés során könnyen elkülöníthető matrix.
- (4) Az elmúlt évtizedben vált elfogadottá az axonokat és azok preterminális szakaszait borító igen finom matrix hüvely, az 'axonal coat' (AC).
- (5) Immunhisztokémiai jelöléssel a KIR fehérállomány kötegeiben jól megfigyelhető periodikusan megjelenő csomók, melyek az ún. nodalis ECM akkumulációk

**Jelen kísérletes munka a fent részletezett kompartmentekben írta le és kvantifikálta a lecticanokhoz tartozó brevican, ill. glycoprotein karakterisztikájú tenascin-R jelenlétét labyrinthus laesio-val összefüggő funkcionális kompenzáció során.**

## **Synapticus plaszticitás**

Synapticus plaszticitás alatt az ingerületátvitel erősségének és hatékonyságának módosulását értjük kémiai synapsisokban. Fiziológias ingerkörnyezetben igen tág határok között képes adaptálni a neuronhálózatok működését. E mechanizmus a tanulás és felejtés, tapasztalyszerzés neurobiológiai alapja, azonban éppúgy megjelenik kóros működés során, neurológiai és pszichiátriai zavarokban, ill. érkatasztrófák után, traumás agyi sérülések, valamint érzékszervi deafferentációk következményeként (Michaluk és Kaczmarek, 2007). Bizonyított, hogy ezen szerteágazó etiológiájú agyi eseményekben közös jelenség a PNN összetételének átmeneti vagy végleges módosulása.

Az elmúlt mintegy két évtizedben vált bizonyítottá az extracellularis proteázok jelentősége a synapticus plasztikus adaptációkban, melyek közé sorolhatjuk a vestibularis kompenzációt is.

## **Vestibularis kompenzáció**

Az egyoldali belsőfül roncsolást követő tünetek közel kétszáz éve ismertek (Flourens 1842; Goltz, 1870; Ewald, 1982). E megfigyelések járultak hozzá a ‘vestibularis compensatio’ (Magnus, 1924) jelenség együttes sejt- és hálózati szintű megértéséhez. Továbbá, először ismerték fel, hogy az egyensúlyérző szervek emlősben nem regenerálnak, azonban a központi egyensúlyozó apparátusban lezajló igen kiterjedt adaptáció eredményeként állt helyre ismét a testtartás, vázizom működés, szemmozgások, táplálékfelvétel stb. Azóta a labyrinthus laesio a synapsisok funkcionális változásainak elfogadott modellje az idegtudományokban.

## CÉLKITŰZÉSEK

---

Laborunk korábbi felismeréseire alapozva céloztuk meg a *Tenascin-R* és *Brevican* molekulák extracellularis jelenlétének morfológiai analizését a vestibularis apparatus agytörzsi neuronjait borító perineuroanlis hálóiban, a belsőfül érzékszervek műtéti roncsolását követően. Az első munkánkhoz hasonlóan 14 nap időtartamú postoperatív időszakban határoztuk meg a megfigyelési periódust.

**I.** A művi belsőfül laesio műtéti pontossága optimalizálást igényelt a felhasználandó kísérleti állat egyedszám csökkentése érdekében. Továbbá, a tüneti kritériumok adaptálására, ill. videorögzítésére is jelen munka során került sor.

**II.** A *Tenascin-R* molekula felelős az ECM térháló összekapcsolásáért, ezért feltételeztük, hogy a postoperatív kompenzáció alatt a TN-R expresszió mérséklődik a vestibularis neuronok PNN-eiben. Megfigyeléseink a következő kérdésekre keresték a választ:

- valóban lecsökken-e a TN-R extracellularis jelenléte a postoperatív 14 napban?
- az agytörzsi vestibularis magkomplexum mely magjaiban ismerhető fel a változás?
- szemikvantitatív módszerrel számszerűsíthető mértékű-e a csökkenés? Az egyes túlélési stádiumok között mutatkozik-e szignifikáns eltérés, amely a kompenzációs folyamatot tükrözi?
- a TN-R változása milyen időtávban követhető, ismervé az általunk választott módszer korlátait?
- a vestibularis funkció hány nap alatt kompenzálódik? Milyen mértékű a funkció visszatérése?
- mutat-e összefüggést a TN-R expresszió csökkenése a vestibularis neuronok méretével, funkciójával?

**III.** A *brevican* – az *aggrecan* és *hyaluronsav* mellett – a PNN leggyakoribb építő molekulája, melynek expresszióját vizsgáltuk a *nucleus vestibularis superior*

neuronjainak PNN-eiben az UL-t követő 14 napos szakaszban. A brevicanról kialakult ismereteink szerint részt vesz gyors saltatoricus ingerületvezetésben, mely kiemelten fontos a NVS-ból eredő szemmozgató pályakötegekben. Fluoreszcens immunhisztokémia morfológiai- és statisztikai elemzésével az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- valóban lecsökken-e a brevican extracelluláris jelenléte a postoperatív 14 napban?
- van-e eltérés a brevican expresszió tekintetében a laesio szerinti ipsi- ill., contralateralis NVS-ban?
- milyen mértékű az expresszió esése az ép állapotban erős-, közepes-, valamint gyenge immunreaktivitású PNN-ekben, ill. milyen időtávlatúak e változások?
- párhuzamba hozhatók-e a szövettani megfigyeléseink a laesios tünetek helyreállításával?

## ANYAGOK és MÓDSZEREK

---

### Étikai jóváhagyás

Állatkísérleteinket a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága által áttekintett és jóváhagyott eljárás alapján végeztük, az alábbi engedélyezési számok alatt: 6/2017/DEMAB; 11/2011/DEMAB. A műtéti beavatkozásokat a Hajdú-Bihar Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Földhivatali Főosztálya HB/06/ÉLB/2270-10/2017 engedélyszámon hagyta jóvá.

### Kísérleti állatok

A brevican expresszió vizsgálata során n=15, a tenascin-R expresszió vizsgálatához n=12, és kontroll csoportként n=3 felnőtt (12-14 hetes) nőtény Wistar (Charles River Laboratory; Strain Crl: WI) patkányt vontunk be a kísérletbe.

### Unilateralis labyrinthus laesio és szövettani feldolgozás

A belső fül egyoldali roncsolását (unilateralis labyrinthus laesio – UL) általános narkózisban végeztük. A patkányok 1, 3, 7 és 14 napos túlélését követően agytörzseikből 8 $\mu$ m vastagságú frontális metszeteket készítettünk, s az alábbi immunhisztokémiai reakcióknak vetettük alá.

A **tenascin-R** lokális expressziójának megfigyeléséhez mind a kontroll, mind pedig az operált állatok szövetein kecskében termelt poliklonális **anti-tenascin-R** IgG (1:300; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) primer antiszérumot alkalmaztunk, amelyet diaminobenzidin-tetrahidroklorid (**DAB**; Sigma-Aldrich) vizualizáció követett.

A **brevican** immunhisztokémiai jelölése előtt chondroitinase-ABC (1:100; 0,02 U / ml; Sigma-Aldrich) enzimátikus emésztést végeztünk. A kettős immunfluorescens jelölés első antitestjeként nyúlban termelt poliklonális **anti-neuN** (1:1000; Merck Millipore, Temecula, CA, USA) antitestet alkalmaztunk, s számrban termelt anti-nyúl

IgG **AlexaFluor 488** (1:1000; Life Technologies, Eugene, Oregon, USA) fluoreszcens szekunder antitesttel tettük láthatóvá.

Másodikként, brevicanra specifikus egérben termelt monoklonális **anti-brevican** (1:200; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) antitestet alkalmaztunk. A reakció vizualizációját másodlagos és harmadlagos inkubálással végeztük, a lóban termelt **anti-egér** IgG biotinilált szekunder antitesttel (1:1000; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), melyet követett a **StreptAvidin AlexaFluor 555** (1:1000; Life Technologies) konjugált harmadlagos reagens.

A fluoreszcens képeket Olympus DP74 kamerával felszerelt Olympus CX31 epifluoreszcens mikroszkóppal rögzítettük (Olympus Ltd., Tokyo, Japán). A PNN-ek kvantitatív elemzéséhez az ImageJ v1.46 (National Institute of Health, Bethesda, MA, USA) szoftvert alkalmaztuk.

### **Tenascin-R expresszió változásnak szemikvantitatív értékelése, statisztikai elemzése**

A megegyező beállítások (fényerő, kontraszt, nagyítás) alkalmazásával készült fénymikroszkópos felvételeket ezután két kutató független megítélése alapján kvantifikáltuk, értékelésüket pedig egy harmadik személy ellenőrizte. A reakció intenzitást a perineuroonális hálókban négyfokozatú skálán határoztuk meg: (-) nincs festődés; (+) gyenge festődés; (++) mérsékelt festődés; (+++) erős festődés. Minden túlélési csoportban 3-4 patkány teljes vestibularis magkomplexumát kvantifikáltuk, külön az ipsi-, és contralateralis oldalak PNN-it.

### **Brevican expresszió változásának kvantitatív elemzése és statisztikai értékelése**

Optikai denzitometriát használtunk a brevican reakció intenzitásának számszerűsítésére a NVS neurojainak PNN-jeiben (Faralli és mtsai., 2016). Minden túlélési csoportban 3-4 patkány NVS-át kvantifikáltuk, külön az ipsi-, és contralateralis oldalak PNN-it.

### **Perineuronális hálók mennyiségi meghatározása**

Morfológiai leletek számszerűsített adatait statisztikai elemzésnek vetettük alá az 'Eredmények' részben ismertetett szempontok szerint.

## EREDMÉNYEK

---

Az ECM különböző lokalizációit szem előtt tartva jelen tudományos megfigyelés négy extracelluláris kompartmentben írta le a matrix változásait az UL-t követő mintegy kéthetes postoperatív szakaszban. Az ECM bizonyos perikaryonok környezetében nagymértékben akkumulálódik, mely formát perineuronális hálóként azonosítottunk. Neuronális nyúlványok és glia által kitöltött terekben, a neuropilben, diffúz hálózatos megjelenésű matrix foglalja el a kompartmentek legnagyobb részét, s ugyancsak a neuropilben belül figyeltük meg az ún. 'axonal coat' formát, melyek 2-4  $\mu\text{m}$  átmérőjű, gyűrű alakú axonhüvelyek. A negyedik ECM akkumulációs forma a nodalilis ECM intenzív pontszerű immunhisztokémai jelölésben, melyek mind perisomaticusan, mind pedig a neuropilben jelen vannak. Ezen utolsó forma csak brevican elleni immunreakcióval vált láthatóvá.

Felismeréseink leírását a két vizsgált ECM alkotó (**tenascin-R** és **brevican**) szerint, külön ismertetjük.

### **Tenascin-R**

Egyoldali labyrinthus laesio következményeként a Tenascin-R expresszió átmentileg lecsökken a vestibularis magkomplexum perineuronális hálóiban és neuropilében.

### **Tenascin-R szemikvantitatív intenzitásértékeinek statisztikai analízise**

Statisztikai összevetésben **szignifikáns különbség mutatkozott a *nucleus vestibularis superiorban* a 3. és 7. túlélési napok szemikvantitatív intenzitás értékei között** ( $P < 0,001$ ), míg az 1. és 3. napok, valamint a 7. és 14. értékeinek összevetésében statisztikai szignifikancia nem nyert bizonyosságot.

**A *nucleus vestibularis medialis magnocellularis* részében az egyes túlélési stádiumok intenzitásértékei között a statisztikai elemzés nem mutatott szignifikáns változást** a vizsgált posztoperatív időszakban.

*A nucleus vestibularis lateralis és nucleus vestibularis descendens rostralis* részében a **intenzitás-változás csak az 1. és 3. napok között mutatkozott szignifikánsnak** ( $P < 0,001$ ), a további túlélési napok intenzitás értékei között ez nem volt bizonyítható.

## **Brevican**

Labyrinthus laesio következményeként a NVS perineuronális hálói átmeneti morfológiai változást mutattak.

### **Brevican optikai denzitometriai intenzitásértékeinek statisztikai analízise**

UL-t követően átmenetileg megváltozott a brevican-pozitív perineuronális hálóok részaránya az erős-közepes-gyenge osztályok között.

**Operált oldal (ipsilateralis):** az 1. postop. napon az *erős* immunfestődésű PNN-k aránya igen radikálisan lecsökkent, mindössze 12,43%, a 3. napon a 23,07%, a 7. napon pedig 6,23% volt. A *közepes* festődési intenzitást mutató PNN-k aránya jelentősen, mintegy 50%-kal megemelkedett a kontrol értékekhez képest; részarányuk az 1. postop. napon 63,8%, a 3. napon 71,15%, a 7. napon 46,29% volt. *Gyenge* festődésű PNN-k aránya is jelentősen megemelkedett, részarányuk az 1. napon 23,07 %, a 3. napon 5,77%, a 7. napon 47,47%. Szignifikancia az 1., a 3. és a 7. műtétet követő napokon ( $\chi^2$  teszt,  $\chi^2(2, n=156 - 337) = 21,05 - 157,36, P < 0,001$ ) ipsilateralisan.

**Ép oldal (contralateralis):** az operált oldali PNN-hoz hasonlóan radikális eltolódás mutatkozott az expressziós mintázatban. *Erős* festődést mutatott a PNN-k 6,99%-a az 1. napon, a 3. napon 17,39%, a 7. napon 5,45%, mely értékek igen erős esést reprezentálnak a kontroll állatokéval összehasonlítva. A *közepes* festésintenzitású PNN-k az 1. napon 76,2%, a 3. napon 72,1%-ban, a 7. napon 49,4%-ban voltak jelen. A *gyengén* festődő PNN-k arányai is igen erős növekedést mutattak, az 1. napon 16,8%, a 3. napon 10,4%, a 7. napon 45,15% -t tettek ki a PNN-val borított neuronok között. Szignifikancia az 1., a 3. és a 7. műtétet követő napokon  $\chi^2(2, n= 143 - 330) = 41,99 - 157,87, P < 0,001$ ) contralateralisan.

### **Labyrinthus laesio hatása a brevican-pozitív perineuronális hálók átlagos optikai denzitás értékeire a nucleus vestibularis superiorban.**

Az UL utáni 1. napon a denzitometriai átlag értékek radikális esését láttuk mindkét oldalon, 70%-os értéket az operált oldalon és 70,3%- t az operált oldalon. A PNN-ek immunreaktivitása bilaterálisan emelkedett a túlélés 3. napjáig, az operált oldalon 84% és 76,78% az ép oldalon. A 7. napon mért átlagértékek a kontroll csoportok értékeinek felére csökkentek (56,3% az operált oldalon és 56,38% az intakt oldali magban). A 14. napon az operált oldal átlagértékei a kontroll érték szintjére emelkedtek, 100.7%-ra, ellenoldalon pedig 89,44%-ra.

A statisztikai analízis szerint az operált és ép oldali NVS-ban szignifikáns optikai denzitás változás volt megfigyelhető, feltételezhetően a laesio következményeként (Kruskal-Wallis egyutas ANOVA és Ranks teszt,  $H_{(4)}=329.20$ ,  $P < 0.001$  (ipsilaterális) és  $H_{(4)}=317.27$ ,  $P < 0.001$  (kontralaterális) (elemszám  $n=118-337$ /túlélési nap/oldal). Az optikai denzitás értékek csökkenést mutattak a kontroll értékekhez képest (\*: szignifikancia), a postoperatív 1., 3. és 7. napon (Dunn-féle *post hoc* próba  $P < 0,001$ ). A 14. napon ismét a kontroll értékekkel megegyező átlagos optikai denzitásértékeket mértünk (Dunn-féle *post hoc* próba,  $P > 0,999$  (ipsilaterális) és  $P = 0,024$  (kontralaterális)).

## KÖVETKEZTETÉSEK

---

### **A tenascin-R vélhető szerepe vestibularis kompenzációban**

1. A tenascin-R-ről ismert, hogy aktiválja a mikroglia sejteket, amelyek válaszul citokineket és növekedési faktorokat választanak ki, beleértve a BDGF-t (brain-derived neurotrophic factor) és a NGF-t (neurotrophic growth factor) (Liao és mtsai., 2005).
2. Az extracelluláris matrix fiziológiás körülmények között a synapsisok stabilizálása révén gátolja jelentős mennyiségű új synapticus kapcsolat kialakulását. A csökkenő festődési intenzitás, vagyis a non-permisszív tenascin-R csökkenő jelenléte feltételezhetően serkenti a synapticus plaszticitást, illetve egyes feltételezések szerint synaptogenesisist, amely jelen kísérleti megközelítésben nem bizonyítható.
3. A tenascin-R vestibularis kompenzációban betöltött lehetséges szerepe a kétoldali vestibularis magok közötti commissuralis útvonalak lehetséges gátlása (Holstein és mtsai, 1999; Bergquist és mtsai, 2008; Malinvaud és mtsai., 2010).
4. A tenascin-R halmozódást több munkacsoport is felismerte a nagy myelinizált axonok Ranvier-féle befűződéseiben (Apostolova és mtsai., 2006; Bekku és mtsai., 2009). A tenascin-R a feszültség függő Na<sup>+</sup> csatornák béta alegységének modulátora, ill. azokat deszenzitizálja az axon membránban (Srinivasan és mtsai., 1998; Xiao és mtsai., 1999).

### **A brevican vélhető szerepe vestibularis kompenzáció során**

1. Valószínűsíthetően a lecsökkent brevican expresszió felgyorsítja a nem vestibularis eredetű afferensek és a NVS neuronjai között meglévő synapsisok adaptációját (Gacek és mtsai, 1988; Dieringer, 1995; de Waele és mtsai, 2000).
2. A 14. posztoperatív napon az operált állatokban mért optikai denzitás mind az ipsi-, mind az ellenoldalon visszaállt a kontroll értékekre. Ez arra utal, hogy a brevican

részt vesz az átrendeződött synapticus állapot stabilizálásában (Frischknecht és mtsai, 2009; Blosa és mtsai, 2013; Favuzzi és mtsai, 2017).

3. A brevican a káliumcsatornák, illetve az AMPA receptorok helyben tartása révén is szabályozza a synapsisok plasztikus adaptálódását a hippocampusban (**20. ábra**) (Favuzzi és mtsai., 2017). A brevican gyors synapticus ingerület átvitelben betöltött szerepe is igazolódott a halló rendszer területén (Blosa és mtsai., 2015; Sonntag és mtsai., 2018). A halló- és vestibularis pályarendszer közös embryonalis eredete, valamint hasonló morfológiai, fiziológiai és neurokémiai tulajdonságaik alapján feltételezzük, hogy a 14. postoperativ napon az NVS-ben megemelkedett brevican expresszió, a gyors synapticus transzmisszió helyreállításával is összefügg.



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**  
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikacio@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/126/2024.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Magyar Ágnes

Doktori Iskola: Fogorvostudományi Doktori Iskola

## A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Magyar, Á.**, Rácz, É., Matesz, K., Wolf, E., Kiss, P., Gaál, B. Á.: Lesion-induced changes of brevican expression in the perineuronal net of the superior vestibular nucleus.  
*Neural Regen. Res.* 17 (3), 649-654, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.4103/1673-5374.320988>  
IF: 6.1
2. Gaál, B. Á., Jóhannesson, E. Ö., Dattani, A., **Magyar, Á.**, Wéber, I., Matesz, K.: Modification of tenascin-R expression following unilateral labyrinthectomy in rats indicates its possible role in neural plasticity of the vestibular neural circuit.  
*Neural Regen Res.* 10 (9), 1463-1470, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.4103/1673-5374.165517>  
IF: 0.968

## További közlemények

3. **Magyar, Á.**: Ajak-Szájpadhasadékkal született gyermekek kezelése, rehabilitációja.  
In: A gyermek-rehabilitáció sajátosságai /Szerk. Vekerdy-Nagy Zsuzsanna, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 145-150, 2019.
4. Buglyó, G., **Magyar, Á.**, Biró, S., Csízy, I., Beyer, D., Molnár, K., Oláh, É.: Nucleotide Transition 390C-T in the Wilms' Tumor 1 Gene: a Risk Factor of Hypospadias?  
*Curr Urol.* 10 (3), 136-139, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000447167>
5. Szakszon, K., Szegedi, I., **Magyar, Á.**, Oláh, É., Andrejkovics, M., Balla, P., Lengyel, A., Berényi, E., Balogh, I.: Complete recovery from psychosis upon miglustat treatment in a juvenile Niemann-Pick C patient.  
*Eur. J. Paediatr. Neurol.* 18 (1), 75-78, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpn.2013.08.002>  
IF: 2.301





6. **Magyar, Á.**, Csizy, I.: Csecsemő-, gyermek- és serdülőkori ovárium ciszták sebészi kezelése.  
*Gyermekgyógyászat*. 62 (3), 148-152, 2011.
7. Józsa, T., **Magyar, Á.**, Cserni, T., Szentmiklósi, J. A., Erdélyi, K., Kincses, Z., Rákóczy, G., Balla, G., Röszer, T.: Short-term adaptation of rat intestine to ileostomy: implication for pediatric practice.  
*J. Invest. Surg.* 22 (4), 292-300, 2009.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/08941930903040106>  
IF: 1.035
8. Cserni, T., **Magyar, Á.**, Németh, T., Paran, S., Csizy, I., Józsa, T.: Atresia of the ileocecal junction with agenesis of the ileocecal valve and vermiform appendix: report of a case.  
*Surg. Today*. 36 (12), 1126-1128, 2006.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00595-006-3302-x>  
IF: 0.698

**A közlő folyóiratok összesített impact faktora: 11,102**

**A közlő folyóiratok összesített impact faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
7,068**

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

Debrecen, 2024.04.02.

