

A VESTIBULARIS RENDSZER CENTRÁLIS KAPCSOLATAI ÉS REGENERÁCIÓJA

DR. HALASI GÁBOR

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS



TÉMAVEZETŐ: DR. MATESZ KLÁRA

Debrecen, 2005

TARTALOMJEGYZÉK

1.	Rövidítések jegyzéke.....	4
2.	Bevezetés.....	5
3.	Célkitűzések.....	7
4.	Irodalmi áttekintés.....	8
4.1.	Vestibularis rendszer kapcsolatai a központi idegrendszeri struktúrákkal.....	8
4.1.1.	A primer afferens rostok centrális kapcsolatai.....	8
4.1.2.	A secunder vestibularis neuronok centrális kapcsolatai.....	9
4.2.	ECM molekulák az idegrendszerben (funkciójuk és kémiai szerkezetük).....	11
4.2.1.	Az idegrendszerben előforduló ECM makromolekulák.....	13
4.2.2.	Proteoglycanok.....	14
4.2.2.1.	Versican.....	15
4.2.2.2.	Neurocan.....	15
4.2.2.3.	Brevican.....	15
4.2.2.4.	Aggrecan.....	16
4.2.2.5.	Phosphacan.....	16
4.2.3.	Hyaluronsav.....	17
4.2.4.	Glycoproteinek.....	19
4.2.4.1.	Fibronectin.....	19
4.2.4.2.	Laminin.....	20
4.2.4.3.	Tenascin.....	20
4.3.	Az ECM makromolekuláinak specifikus szerveződése az idegrendszerben.....	21
4.3.1.	Perineuronal net.....	21
4.3.2.	Transitionalis zóna.....	23
4.4.	Az ECM receptorai.....	24
4.4.1.	A dystrophin-glycoprotein komplex (DGC).....	25
4.4.1.1.	A DGC szerkezete.....	25
4.4.1.2.	Dystrophinok.....	26
4.4.1.3.	Dystroglycanok.....	26
4.4.2.	Integrin receptorok.....	27
5.	Anyagok és módszerek.....	29
5.1.	Kísérleti állatok, a kísérletekhez szükséges engedélyek és a kísérleti állatok altatása.....	29
5.2.	Pályakövetéses módszerek.....	29
5.2.1.	Neurobiotinnal történő pályakövetéses vizsgálatok.....	30
5.2.2.	Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) történő elektronmikroszkópos vizsgálatok.....	31
5.3.	Az extracelluláris mátrix makromolekuláinak illetve feltételezett receptorainak kimutatása béka idegrendszerében.....	32
5.3.1.	Az extracellularis matrix makromolekulák kimutatása.....	33
5.3.2.	A DGC molekulák kimutatása.....	33
5.4.	A nervus vestibulocochlearis regenerációjának vizsgálata.....	34
5.4.1.	Quantitatív vizsgálatok.....	35
5.4.1.1.	Optikai denzitás mérés.....	35
5.4.1.2.	Statisztikai vizsgálatok.....	35
6.	Eredmények.....	37
6.1	A nucleus vestibularis descendens kapcsolatainak vizsgálata patkányban.....	37

6.1.1.	Anterográd projekció	37
6.1.2.	Retrográd projekció	40
6.2.	A nucleus vestibularis superior kapcsolata a nucleus motorius n. oculomotorii-val és a nucleus ruberrel	42
6.3.	Az extracelluláris mátrix makromolekulák normál eloszlása a béka idegrendszerében	44
6.4.	A dystrophin-glycoprotein komplex elemeinek eloszlása a béka idegrendszerében	49
6.5.	A nervus vestibulocochlearis regenerációjának vizsgálata	54
6.5.1.	A regenerálódó rostok neurobiotinos jelölése	55
6.5.2.	A hyaluronsav eloszlási mintázatának változása post-ganglionáris vestibularis axotómiát követően	56
6.5.3.	A laminin eloszlási mintázatának változása post-ganglionáris vestibularis axotómiát követően	61
7.	Megbeszélés	63
7.1.	A nucleus vestibularis descendens szekunder vestibularis neuronjainak anterográd kapcsolatai	63
7.1.1.	A NVD kapcsolatai a diencephalikus központokkal	63
7.1.2.	A NVD kapcsolatai a mesencephalikus központokkal	64
7.1.3.	A NVD kapcsolatrendszere a rhombencephalonban	65
7.1.4.	A NVD gerincvelői kapcsolata	67
7.2.	A NVD szekunder neuronjainak retrográd kapcsolatai	68
7.3.	A nucleus vestibularis superior és a nucl. motorius n. oculomotorii-val és nucleus ruberrel való kapcsolatának elektronmikroszkópos vizsgálata	69
7.4.	Az idegrendszerben előforduló ECM makromolekulák, receptoraik és lehetséges szerepük a vestibularis regenerációban	70
7.4.1.	Hyaluronsav	70
7.4.2.	Laminin	73
7.4.3.	Tenascin-C	74
7.4.4.	Phosphacan	75
7.4.5.	Fibronectin	76
7.5.	A perineuronalis net változása a vestibularis regeneráció során	77
7.6.	A transitionális zóna változása a vestibularis regeneráció során	78
7.7.	Az extracelluláris mátrix (ECM) receptora	81
7.7.1.	A dystrophin-glycoprotein komplex (DGC) a béka idegrendszerében	81
7.7.2.	Integrin receptorok	83
7.8.	Az ECM makromolekulák szerepe a szinaptikus plaszticitásban és remodellingben	83
7.9.	Konklúzió	85
8.	Összefoglalás, eredmények jelentősége	86
9.	Summary	87
10.	Köszönetnyilvánítás	88
11.	Irodalomjegyzék	89
12.	Saját közlemények jegyzéke	102
13.	Függelék	105

1. A DOLGOZATBAN ELŐFODULÓ RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

3, III:	nucleus nervi oculomotorii	MGV:	corpus geniculatum mediale, pars ventralis
7, nVII:	nucleus facialis	Min:	nucleus minimus
ABC:	avidin-biotin complex	ml:	lemniscus medialis
Amb:	nucleus ambiguus	mlf:	medial longitudinal fascicle
An:	aggrecan	MMP:	matrix metalloproteináz
Aq:	aqueductus cerebri	MN:	motoneuron
BDG:	beta-dystroglycan	MOL:	stratum moleculare cerebelli
bHABC:	biotinilált hyaluronsav próba	MVN:	nucleus vestibularis medialis
Bn:	brevican	NB:	neurobiotin
CA:	commissura anterior medullae spinalis	nIX:	nervus glossopharyngeus
Cc:	canalis centralis	Nn:	neurocan
CcN:	nucleus cervicalis centralis	nspV:	nucleus tractus spinalis nervi trigemini
Cer:	cerebellum	NVD:	nucleus vestibularis descendens
CG:	substantia grisea centralis	nVIII:	nervus vestibulocochlearis
CRP:	komplement reguláló protein	NVL:	nucleus vestibularis lateralis
ctg:	tractus tegmentalis centralis	NVM:	nucleus vestibularis medialis
Cu:	nucleus cuneatus	NVS:	nucleus vestibularis superior
CS:	chondroitin szulfát	nX:	nervus vagus
DC:	nucleus cochlearis dorsalis	nXI:	nervus accessorius
DF:	funiculus dorsalis medullae spinalis	OT:	tectum opticum
DGC:	dystrophin-glycoprotein komplex	P:	stratum ganglionare cerebelli
DH:	cornu posterius medullae spinalis	PAG:	substantia grisea centralis
Dk:	nucleus Darkschewitsch	PCR:	formatio reticularis pars parvocellularis
dlf:	fasciculus longitudinalis dorsalis	PG:	proteoglycan
Dp:	dystrophin	Pgi:	formatio reticularis pars paragigantocellularis
DpMe:	nucleus mesencephalicus profundus	PHA-L:	Phaseolus vulgaris leucoagglutinin
DR:	radix dorsalis medullae spinalis	PHy:	nucleus prepositus hypoglossi
DRP:	dystrophin related peptide	PN:	perineuronális háló vagy net
DVN:	nucleus vestibularis descendens	Pn:	phosphacan
ECM:	extracelluláris mátrix	PPT:	nucleus pretectalis posterioris
EGF:	epidermal growth factor	PTR:	proteoglycan tandem repeat
erk:	extracellular regulated kinase	py:	tractus corticospinalis (pyramis pálya)
EW:	nucleus Edinger-Westphal	RDG:	protein-kötő tripeptid szekvencia (Arg-Gly-Asp)
FLM, flm:	fasciculus longitudinalis medialis	RHAMM:	receptor for hyaluronan mediated motility
FN, fn:	fibronektin	RMC:	nucleus ruber, pars magnocellularis
FR:	formatio reticularis	RPC:	nucleus ruber, pars parvocellularis
GAG:	glycosaminoglycan	scp:	pedunculus cerebellaris superior
Gi:	formatio reticularis pars gigantocellularis	SO:	oliva superior
GP:	glycoprotein	SOL, trSol:	nucleus tractus solitarii
Gr:	nucleus gracilis	SVN:	nucleus vestibularis superior
GR:	stratum granulosum cerebelli	TN:	tenascin
HA:	hyaluronsav	tspV:	tractus spinalis nervi trigemini
IAF:	fibrae arcuatae internae	tVCer:	tractus vestibulocerebellaris
IC:	nucleus interstitialis Cajal	TZ:	tranzicionális, belépési vagy átmeneti zóna
IMLF:	nucleus interstitialis mlf (Cajal)	V/3:	nervus mandibularis projekciós területe
InWh:	colliculus superior intermedier fehérállomány	VF:	funiculus ventralis medullae spinalis
IO:	oliva inferior	VI:	nucleus abducens
IR:	formatio reticularis pars intermedius	VIIg:	genu nervi facialis
IV.:	ventriculus quartus	Vmot:	nucleus motorius nervi trigemini
KS:	keratán-szulfát	Vn:	versican
LTF:	lateral tegmental field	VR:	radix ventralis medullae spinalis
LVN:	nucleus vestibularis lateralis	vSpCer:	tractus spinocerebellaris
MdD:	formatio reticularis pars dorsalis	XII:	nucleus motorius nervi hypoglossi
MdV:	formatio reticularis pars ventralis		
MGD:	corpus geniculatum mediale, pars dorsalis		

2. BEVEZETÉS

A vestibularis rendszer feladata az izomtónus szabályozásán keresztül a test mindenkori helyzetének megtartása a gravitáció ellenében. A testhelyzet folytonos változásának következtében állandó információáramlás történik a perifériás receptorok felől az agytörzsi vestibularis magokba, ahol egy rendkívül komplex ingerület feldolgozás történik. Az innen származó ingerület szabályozza az izomtónust, biztosítja a fej helyzetének megváltozását követő reflexes szemmozgást és befolyásolja a vegetatív központok működését is [1-3]. Az egyensúlyozó szerv összetett érzékszerv, melynek lényegi része, a tágabb értelemben vett labirintus már a primitív, vízben élő gerinceseknél is megtalálható, mint áramlásregisztráló érzékszerv. Ez a része megtartotta funkcióját, és a filogenesis magasabb fokán álló élőlényeknél is hasonló elveken működik. A receptorok egy része módosult formában megőrizte ezt a működését, és más idegrendszeri területekkel együtt az egyensúlyozó rendszert alkotja. Az egyensúlyozó receptorok közül a szöggyorsulást érzékelő, félkörös ívjáratokban elhelyezkedőket ampullaris receptoroknak is nevezik. A lineáris gyorsulásra érzékeny receptorok, az otolith vagy macularis szervek a sacculusban, utriculusban és alacsonyabb rendűekben a lagaenában helyezkednek el. A receptorokat ellátó primer neuronok axonjai a nervus vestibulocochlearisban haladnak az agytörzs felé, ahol az egyensúlyozó és a halló magokban végződnek. Az itt található másodlagos neuronok a központi idegrendszer különböző képleteivel létesítenek kapcsolatot.

Számos vizsgálat ellenére ma sem tudjuk pontosan, hogy az egyedi vestibularis magok milyen szerepet játszanak a vestibularis rendszer fiziológiai működésében. Az egyes magok között lévő funkcionális különbségek oka feltehetően összefügg az egyensúly érző receptorok eltérő agytörzsi projekciójával, és az egyes magok különböző központi idegrendszeri összeköttetésével. Nagyon kevés adat van arra vonatkozóan, hogy a vestibularis magok végződési területei közül melyek azok, amelyek közvetlen reciprok kapcsolatban vannak a kiindulási állomással.

A vestibularis rendszer normál kapcsolatainak morfológiai vizsgálata rendkívül fontos lépés ahhoz, hogy a nervus vestibularis lézióját követő változásokat megismerhessük. A lézió következtében magasabb rendű gerinceseken a tünetek kompenzálódása figyelhető meg, melynek hátterében a vestibularis kapcsolatok átrendeződését tételezik fel. A kompenzáció során bekövetkező élettani változások megértéséhez is hozzásegíthet a normál kapcsolatok fény- és elektronmikroszkópos szerkezetének megismerése. Alacsonyabb rendű gerincesekben is

megfigyelhető hasonló kompenzáció, azonban a léziót követően a vestibularis rostok e fajokban regenerálódni is képesek. A regeneráció során bekövetkező neuronális változások megfigyelése hozzájárulhat ahhoz, hogy a kialakuló mikrokörnyezeti változásokat, melyek lehetővé teszik az alacsonyabb rendűekben a központi idegrendszer regenerációját, megismerhessük.

Az utóbbi időben egyre több adat szól amellett, hogy az extracelluláris mátrix (ECM) makromolekulái fontos szerepet játszanak az idegrendszer fejlődésében, szerveződésében, és e molekulák jelenléte illetve hiánya befolyásolja az idegrendszer regenerációs készséget. Az ECM szerepét az idegi regenerációban korábban elsősorban *in vitro* körülmények között vizsgálták. Napjainkban egyre több *in vivo* vizsgálattal kívánják felderíteni az ECM makromolekulák regenerációban betöltött szerepét. Az *in vivo* vizsgálatokra alkalmas modell a kétéltűek vestibuláris rendszere, ahol a plaszticitás és a regeneráció hátterében álló mechanizmusok és ezen belül az ECM szerepe egyaránt vizsgálható. Alacsonyrendű gerincesekben az átvágott II. és VIII. agyidegek illetve gerincvelő hátsó gyökere regenerációra képes. Ez azt jelenti, hogy az átvágott idegrostok képesek benőni a központi idegrendszerbe és ott funkcionális kapcsolatokat tudnak kialakítani [4,5]. Kevés *in vivo* adat van arról, hogy az ECM makromolekuláinak és receptorainak eloszlása hogyan módosul a vestibularis lézió és kompenzáció során, milyen változások következnek be a jelátviteli mechanizmusokban és a neurotranszmitterek expressziójában. Több ismert receptor mellett az utóbbi években előtérbe került az ECM egyik feltételezett receptora, a dystrophin-glycoprotein komplex (DGC), amely az extracelluláris mátrix egyes elemei és a sejtek közötti kapcsolat kialakításában játszik fontos szerepet.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A vestibularis magok centrális kapcsolatai

Vizsgáltuk a **nucleus vestibularis descendens** (NVD) antero- és retrográd kapcsolatait patkányban, amely korábbi, az intézetünkben folyó, a többi vestibularis mag centralis kapcsolatainak feltérképezését szolgáló munkák folytatása.

A nucleus vestibularis descendens antero- és retrográd kapcsolatainak megismerésén túl megkezdtük a vestibularis magok centrális kapcsolatainak ultrastruktúrális vizsgálatát is. E munka első lépéseként a **nucleus vestibularis superior** (NVS) kapcsolatait tanulmányoztuk az oculomotorius mag motoneuronjaival és a nucleus ruber idegsejtjeivel.

A vestibularis magok összeköttetéseinek megismerésével választ kaphatunk arra, hogy az egyes magok milyen központi struktúrákkal létesítenek kapcsolatot. Ezek ismeretében további kísérletek tervezhetők az egyedi vestibularis magok szerepének megismeréséről a vestibularis léziót követő tünetek kialakulásában és az azt követő kompenzációban. A rendszer kapcsolatainak felderítése klinikai szempontból is jelentős lehet, hiszen a vestibularis rendszer kóros működése kapcsán kialakuló tünetek, majd azok kompenzálódásának neuronális háttere csak a normál szerkezet és működés ismeretében lehetséges.

Az extracellularis matrix makromolekuláinak és feltételezett receptorainak megoszlása az idegrendszerben

Az ECM makromolekulák idegi regenerációban betöltött szerepének megismeréséhez vizsgáltuk a **hyaluronsav**, **laminin**, **tenascin-C**, **fibronektin** és a **phosphacan** molekulák normál eloszlását a béka idegrendszerében. Ennek a kiegészítéseként tanulmányoztuk az ECM egyik feltételezett receptorának, a **dystrophin-glycoprotein komplex** (DGC) egyes komponenseinek megoszlását a béka idegrendszerében. Az így megismert eloszlási mintázatok referenciaként szolgálhatnak a regenerációs kísérletekben.

A hyaluronsav és a laminin lehetséges szerepe a vestibularis regenerációban

In vivo kísérletekben vizsgáltuk a hyaluronsav és a laminin megoszlásának változását a vestibularis ideg átvágását követő regeneráció során békákban. A változások időbeli lefolyása adatokat szolgáltat az ECM permisszív és non-permisszív szerepéről az idegi regenerációban.

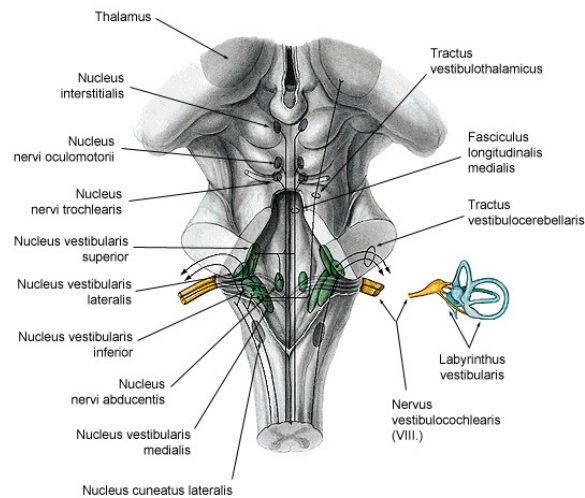
4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

4.1 A vestibuláris rendszer kapcsolatai a központi idegrendszeri struktúrákkal

4.1.1. A primer afferens rostok centrális kapcsolatai

A nervus vestibulocochlearis pars vestibularisának dúca a ganglion vestibulare, amely bipoláris idegsejteket tartalmaz. A sejtek perifériás nyúlványai a vestibularis receptorokban, centrális nyúlványaik pedig négy vestibularis magban végződnek, így a nucleus vestibularis superiorban (Bechterew) (NVS), a nucleus vestibularis medialisban (Schwalbe) (NVM), a nucleus vestibularis lateralisban (Deiters) (NVL) és a nucleus vestibularis descendensben (Roller) (NVD) (1. ábra). Minden egyes vestibularis magnak különböző szerepe van a test egyensúlyi helyzetének fenntartásában, a három-dimenziós térben való orientációban, és a vestibularis léziót követő tünetek kompenzálásában, akár azt is mondhatnánk, hogy minden magnak saját „egyénisége” van: „Each of the four principal nuclei has its individual characteristics, its own ‘personality’, so to speak.” [6]. Amikor a vestibularis rendszer anatómiai felépítését részleteiben vizsgáljuk, annak szerveződése sokkal összetettebbnek tűnik, mint azt korábban gondolták. Meglepő az is, hogy milyen specifikus kapcsolatok vannak a vestibularis mag-rendszer egyes – néha egészen kicsi – alegységei, és a központi idegrendszer más részei között. Ez is bizonyítja azt, hogy a funkcionális szerveződés meglehetősen bonyolult, és hogy a klasszikus élettani kísérletekben a durva megközelítések nem visznek közelebb a pontos információhoz. Szerencsére az utóbbi időben egyre finomabb neurofiziológiai és neuromorfológiai módszereket fejlesztettek ki, amelyek segítségével sejtszinten is vizsgálhatók a vestibularis magok neuronjai [7].

A vestibularis magok eltérő funkcióinak egyik oka az lehet, hogy a primer afferens vestibularis rostok különböző végződési területtel rendelkeznek az agytörzsi vestibularis magokban. Az erre vonatkozó irodalmi adatok szerint a sacculus és utriculus elsősorban a NVL-ba [8], a félkörös ívjáratok pedig a NVM-ba, NVS-ba és a NVD-be projiciálnak [9], azonban a végződési területekben jelentős az átfedés [8]. A különbség másik oka lehet, hogy az egyes vestibularis magok neuronjainak központi idegrendszeri struktúrákkal alkotott kapcsolatai részben eltérnek egymástól.



1. ábra. Az emlősök egyensúlyozó rendszerének vázlatos áttekintése.
(Az ábrákban található rövidítések magyarázatát lásd a Rövidítések jegyzékében.)

4.1.2. A sekunder vestibularis neuronok centrális kapcsolatai

A klasszikus leírások szerint a másodlagos vestibularis neuronok axonjai fel- és leszálló pályákat alkotnak, amelyek nagyrészt a szemmozgásokért felelős agyidegi magokhoz és a gerincvelőhöz haladnak. A felszálló rostok a NVS-ból, NVM-ből, és a NVD-ből a fasciculus longitudinalis medialisba belépve (FLM) bilateralisan szállnak fel a mesencephalon területéig. Ezek a rostok a külső szemizmok motoros magjaihoz futnak, ahová serkentő és gátló impulzusokat egyaránt szállítanak. Ennek a kapcsolatrendszernek a részletei, főképpen fiziológiai vizsgálatok eredményei alapján ismertek emlősökben [10-12].

A horizontális vestibulo-ocularis reflexben (VOR) résztvevő szekunder vestibularis neuronok elsősorban a m. rectus lateralis és medialis beidegzéséért felelős külső szemmozgató agyidegi magokba projiciálnak. Az abducens mag serkentő bemenetet kap az ellenoldali, és gátló bemenetet az ipsilateralis NVL-ből és NVM-ből [13]. A m. rectus medialisnak az oculomotorius magban elhelyezkedő motoneuronjai serkentő bemenetet kapnak az ipsilateralis NVL-ből. A VOR kialakításáért felelős szekunder vestibularis neuronok a NVS-ből és a NVM-ből erednek. A vestibularis magok és a szemmozgató agyidegi magok közötti kapcsolat monoszinaptikus jellegét macskában és nyúlban is igazolták [14]. Elektronmikroszkópos vizsgálatokkal nyulak oculomotorius magjában GABA és glicin tartalmú terminálisokat mutattak ki [15], azonban azt nem vizsgálták, hogy ezeknek az eredő sejtjei hol találhatók. Mivel az emlősök vestibularis

magjai közül csak a NVS-ban nem találtak glycin immunreaktivitást, feltételezik, hogy a tisztán GABA pozitív terminálisok a NVS-ból erednek [16]. Alacsonyabb rendű élőlényekben is megtalálták a vestibuloocularis összeköttetéseket, de a rostok pontos eredetét a vestibularis magkomplexen belül csak az NVL-ból írták le [17]. A felszálló rostok egy része a thalamusig halad, és elsősorban a ventrobasalis magokban valamint a parafascicularis magokban vagy azokkal homológ struktúrákban végződik [18-21]. A vestibularis magokból erőteljes projekció történik a kisagy felé, ahol a rostok moharostok formájában végződnek a vestibulocerebellum granularis rétegében mind emlősökben, [22] mind békában [8,21].

A vestibularis magokból eredő leszálló rostok a gerincvelőben folytatódnak, a klasszikus leírások szerint két pálya szállítja az információt a funiculus anterior területén: a tractus vestibulospinalis és a fasciculus longitudinalis medialis (FLM) leszálló része. A FLM leszálló része, amely főleg a NVM-ből indul az azonos oldalon halad. A második a Deiters magból eredő, ipsilateralisan haladó tractus vestibulospinalis, amihez kismértékben a NVD rostjai is csatlakoznak. Újabban egy harmadik leszálló pályát is leírtak tractus vestibulospinalis caudalis néven. A pálya a NVM-ban és a NVD-ben kezdődik bilateralisan halad [23]. Más leírások a vestibulospinalis projekciót keresztezett és keresztesztelen medialis, valamint lateralis részekre osztják [24]. A tractus vestibulospinalis caudalis a sacralis gerincvelőig száll le, ahol a lamina VII és VIII területén végződik [25], a többi vestibulospinalis pálya végződési területe a cervicalis gerincvelő területére korlátozódik. Újabb irodalmi adatok szerint nemcsak az elülső kötegben, hanem a funiculus lateralis és posterior területén is találhatók leszálló vestibularis rostok [26]. Ugyanezek a kísérletek azt is megmutatták, hogy a végződési terület sem korlátozódik az elülső szarv területére, nagyszámú rost végződik más laminákban is.

Mind a leszálló, mind a felszálló rostok kiterjedt kapcsolatban vannak a formatio reticularissal emlősökben [27]. Jóllehet a másodlagos vestibularis neuronok közvetlenül is végződnek a nucleus dorsalis nervi vagi területén és a nucleus tractus solitariiban [1], feltételezik hogy a vestibularis magoknak a formatio reticularisban végződő rostjai azok, amelyek erőteljesen befolyásolják a cardiorespiratorius rendszer aktivitását. A klinikai gyakorlatban jól ismert, hogy a vestibularis rendszer izgalma hányást és a szédülést vált ki és valószínűsíthető, hogy ezek a hatások is a formatio reticularison keresztül érvényesülnek. Ugyancsak fontos lehet a formatio reticularis területén végződő vestibularis rostrendszer a mozgás koordinációjában [28]. Alacsonyabb rendűekben a vestibularis rendszer és a formatio reticularis kapcsolatát csak a NVL-ra vonatkozóan ismerjük [21]. A fenti kapcsolatok mellett az egyedi vestibularis magok vetítenek

a vestibularis magkomplex azonos és ellenoldali tagjai felé is. A commissuralis kapcsolatok erősségét a kétoldali vestibularis magok között rendkívül egymásnak ellentmondóan írják le az irodalomban [29-31]. Ezek az összeköttetések emlősökben elsősorban gátlók [32], békában pedig serkentők [33]. Az azonos oldali magok közötti összeköttetéseket, az internuclearis rostokat, emlősökben különböző erősségűnek írták le az egyes magok között [34,35].

Az idegrendszer más területeihez hasonlóan, a vestibularis rendszerben is leírtak reciprok kapcsolatokat. Ezek azonban csak a spinovestibularis neuronok eredéséről szólnak és a közleményekben igen sok az egymásnak ellentmondó adat [3,24].

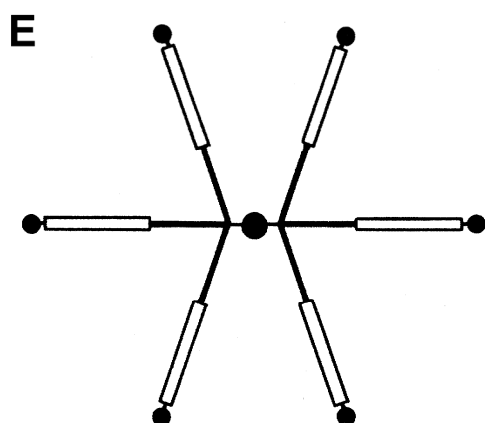
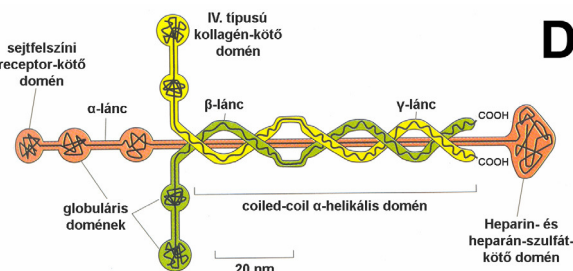
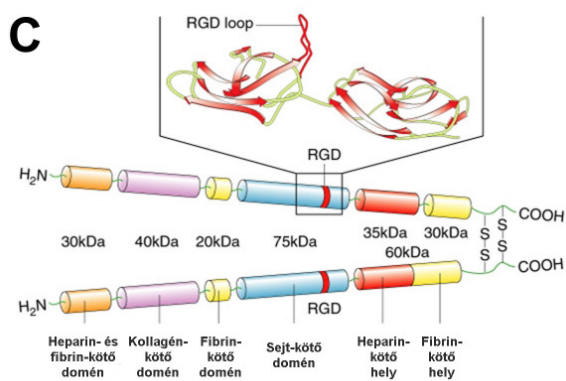
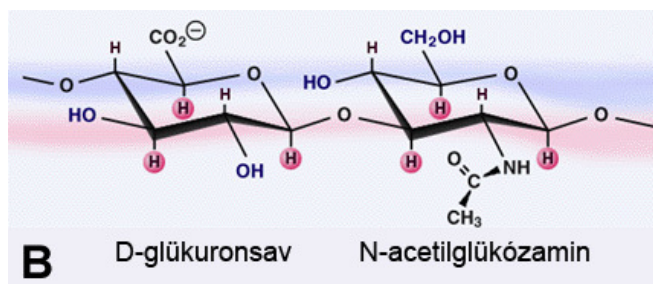
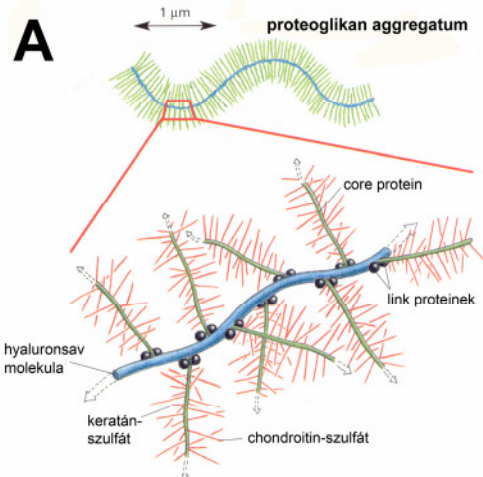
A nagyszámú irodalmi adat ellenére elég sok az ellentmondás a végződési területeket illetően, aminek egyik oka az, hogy a korábbi kísérletekben elsősorban axondegenerációs technikákat alkalmaztak, ami alkalmas ugyan a pályák követésére, de a finomabb részletek felismerését nem teszi lehetővé. A kísérleti eredmények különbözőségének másik oka, hogy korábban nem volt lehetőség arra, hogy a vestibularis magkomplex egyes tagjainak összeköttetését külön-külön vizsgálják. Ezeket a nehézségeket hidalják át az axonjelöléses módszerek, amelynek során a jelölőanyag *in vivo* vándorol antero- és/vagy retrográd irányban. Ezek a módszerek nem károsítják a neuront, tehát a jelölőanyag élő szövetben transzportálódik, másrészt olyan vékony rostok és azok végződései is láthatóvá tehetők, amelyek a degenerációs és más technikákkal rejtve maradtak.

4.2. Az idegrendszerben előforduló extracelluláris mátrix (ECM) molekulákról és receptorairól

Az ECM-et szekretált makromolekulák hálózata alkotja. Attól függően, hogy milyen szövet-típusban vizsgáljuk, összetétele és formája nagymértékben különbözik, például porcszövetben az ECM alkotja az alapállomány nagy részét, míg izomszövetben elsősorban a lamina basalis alkotásában vesz részt.

A perifériás idegrendszerben elsősorban a Schwann sejtek lamina basalisban és a neuromuszkuláris junkcióban van fontos szerepe [36]. Korábban úgy gondolták, hogy a központi idegrendszerben az ECM makromolekulái csak az erek és az agyburkok területén találhatók meg, mivel a központi idegrendszer területén másutt nem található membrana basalis [36]. A szinaptikus kapcsolatok kivételével sehol sem találták meg azokat az elektron-denz alkotóelemeket, amelyek más szövetekben az ECM molekulák jelenlétére utalnak és ennek alapján azt feltételezték, hogy ezen elemek más szövetben betöltött funkcióját a központi

idegrendszerben a szinapsisokban kimutatott különböző sejt-adhéziós molekulák (N-CAM, L-1) töltik be [37]. Más vizsgálatok ugyanakkor azt mutatták, hogy a központi idegrendszer szervezett ECM-al rendelkezik [38].



2. ábra. Vázlatos rajzok a proteoglikan aggregatum (A), a hyaluronsav (B), a fibronectin (C), a laminin (D) és a tenascin-C (E) szerkezetéről.

Az elmúlt évek során vált ismertté, hogy az ECM makromolekulái fontos szerepet játszanak az idegrendszer regenerációjában és plaszticitásában ahol permisszív és non-permisszív tulajdonságúak is lehetnek [39]. Az egyre szaporodó kísérleti adatok ellenére számos nyitott kérdés maradt az ECM molekulák és receptoraik szerepéről az idegrendszer normál és kóros működésében valamint a regenerációs folyamatokban [40]. A különböző életkorban, stádiumban és eltérő fajokban megfigyelhető regenerációs képességbeli különbségek részben az ECM molekulák eltérő eloszlásával magyarázhatóak. Az egyes funkciók ellátásáért különböző fehérjedomainek felelnek, melyek akár egyazon fehérjén belül is megtalálhatóak. Ezen funkciókat az ECM fehérjék derivátumai is elláthatják, azonban néha éppen ellenkező hatást érnek el, mint amit kifejtettek a teljes molekulában [41]. Éppen ezért ezen peptid-fragmenteknek a regenerációban betöltött szerepüket külön is vizsgálják, mérlegelve a későbbi terápiás alkalmazásukat.

Mind a makromolekulák, mind azok származékai, csak megfelelő receptorokhoz kötődve tudják kifejteni hatásukat, éppen ezért permisszív vagy non-permisszív tulajdonságuk attól is függ, hogy receptoraik expresszálódnak-e az adott szövetekben [42-44]. Az ECM és a sejtek közötti kommunikáció fenntartásában többféle molekulacsoport vesz részt, pl. integrin receptorok, caveolinok, és a dystrophin-glycoprotein complex (DGC) is, mely receptorokon keresztül az ECM makromolekulái fontos szerepet játszanak a sejten kívüli tér és a sejt belseje közötti információ átadásban. A jelátviteli folyamatokban nagy jelentőséget tulajdonítanak a fehérjék foszforiláltsági szintjében bekövetkező változásoknak és az ebben résztvevő kinázoknak és foszfatázoknak.

4.2.1 Az idegrendszerben előforduló ECM makromolekulák

Jelen ismeretek szerint a központi idegrendszerben a következő ECM molekulák találhatóak meg (Hartmann és Maurer, 2001 után módosítva és kiegészítve [45]):

PROTEOGLYCANOK (PG)

Lecticanok/hyalektinek

Aggrecan
Versican
Neurocan
Brevican
Phosphacan (mátrix asszociált PG)
Sejtfelszíni PG-ok: neuroglycan C, NG2, receptor
protein tyrosine phosphatase related to phosphacan
Kis leucin-gazdag PG-ok (SRLPs)
Decorin
Biglycan
Testican

Egyéb:

Perlecan
Serglycin

GLYCOPROTEINEK (GP)

Laminin
Fibronectin
Tenascin (TN)-C, -R, -Y

GLYCOSAMINOGLYCANOK (GAG)

Hyaluronsav vagy hyaluronan (HA)

KOLLAGÉNEK

IX, XIII, XVIII. típusú

4.2.2. Proteoglycanok

A **lecticanok** a chondroitin-szulfát proteoglycanok közé tartoznak, ebbe a csoportba tartozik az aggrecan, a versican, a neurocan és a brevican. Ezen PG-k közös sajátossága, hogy a core proteinjük szekvenciája HA kötő ún. link modult tartalmaz (2A. ábra). Az aggrecant először porcban, a versicant fibroblastokban, míg a neurocant és a brevicant az idegrendszerben mutatták ki [46,47].

A proteoglycanok általános szerkezete: A proteoglycanok (PG) nagy méretű makromolekulák, amelyek egy core proteinből és az ahhoz kovalensen kötődő glycosaminoglycan (GAG) oldalláncokból állnak. A GAG-ok ismétlődő diszacharid molekulák lineáris polimerjei, a diszacharidokat hexózaminok és karboxilát- vagy szulfát-észterek alkotják. A GAG molekulák közé tartozik a chondroitin-szulfát, dermatán-szulfát, keratán-szulfát, a heparán-szulfát és a heparin illetve a hyaluronsav, amely az egyetlen olyan GAG molekula amely szabad formában is megtalálható az ECM-ben, nem csak a PG-ok oldalláncaként. A core proteinek illetve a C- és N-terminális domének az egyes lecticanokban eltérő szerkezetet mutatnak. A PG-ok szintézisüket követően felveszik érett formájukat, mely egy kémcső-tisztító keféhez hasonlítható, a core proteinen hosszú GAG oldalláncokkal. A core protein N-terminális végén találunk egy immunglobulin-szerű hurkot (Ig-like loop), illetve két proteoglycan tandem ismétlődését (PTR = proteoglycan tandem repeat). Ezt a két alegységet együttesen G1-doménnek nevezzük. Az aggrecan tartalmaz még egy hasonló felépítésű G2 domént is, azonban ez utóbbi a versicanból, a neurocanból és a brevicanból hiányzik. A G1 doménen egy hyaluronsav-kötő régió van (link modul), mely egy hármas hurok és 5 ismétlődő diszacharid egységet fog át [48]. E régiónak fontos szerepe van az ECM-ben található hyaluronsav kimutatásában is. R. Tammi és M. Tammi az aggrecan hyaluronsav-kötő doménjének biotinilálásával a szövetben előforduló hyaluronsav kimutatására alkalmas próbát (bHABC) fejlesztettek ki [49], ezt alkalmaztuk mi is a hyaluronsav szöveti eloszlásának detektálásához (Részletesebben lásd az Anyagok és Módszerek fejezetet). Emellett a C-terminális domén tartalmaz egy EGF- (epidermal growth factor) és egy komplement reguláló protein (CRP) domént, amelyeken keresztül kapcsolódnak a lecticanok a szénhidrát és protein ligandjaikhoz. Az N-terminális részhez nemcsak hyaluronsav, hanem más szénhidrát molekula is képes kapcsolódni.

Az N- és a C-terminális globuláris domén között egy kapcsoló központi domén is található, melynek mérete és szekvenciája nagyban különbözik a lectikánok között. A centrális doménen található a GAG-kötő helyek, számuk változó, az aggrecanban kb. 120, a versicanban

kb. 20, a neurocanban kb. 7, míg a brevicanban csak 3 kötőhely található. Ehhez a centrális doménhez kapcsolódhatnak keratán-szulfát oldalláncok is [50]. A lektikánok matrix metalloproteinázok (MMP-1, -2, -3 és -8) katalizálta proteolitikus folyamatokon is átesnek, melynek végtermékei az ECM kialakításában fontos szerepet tölthetnek be.

4.2.2.1. Versican

A versican 12-15 chondroitin-szulfát oldalláncot tartalmaz [51], molekulásúlya 370 kDa körüli. A versican tartalmaz egy EGF-szerű, egy lektin-szerű, és egy, a komplementet szabályozó domént a core protein C-terminális végén. Ezen doméneknek a sejt-sejt és sejt-mátrix kapcsolatokban van fontos szerepük, és szénhidrátok kötésén keresztül fejtik ki hatásukat, az EGF doménhez pedig fibulin-1 kötődik. A versicant elsősorban oligodendrocytákban és Schwann sejtekben [52], illetve egyes idegsejtek körül a PN-ben (lásd később) mutatták ki [53]. A versican receptorai és ligandjai közé tartoznak a glycolipidek illetve a CD44 [54]. A versicannak elsősorban non-permisszív szerepe van az idegrendszer regenerációjában [55,56], és csak kivételes esetben mutatták ki permisszív hatását [47,57,58].

4.2.2.2. Neurocan

Embrionális korban a neurocan core protein 1257 aminosavból áll (136 kDa) [59]. A core protein egy dupla-hurok domént tartalmaz, amely hyaluronsavat képes kötni, illetve C-terminálisán EGF-szerű, lektin-szerű domének találhatók. Felnőtt állatokban a neurocan 68 kDa-os formája található meg, amelyhez csak egy chondroitin-szulfát oldallánc kapcsolódik. A neurocant idegsejtek (kisagyi granuláris sejtek illetve Purkinje sejtek) és astrocyták termelik [60]. A neurocan előszeretettel kapcsolódik N-CAM, Ng-CAM, Nr-CAM, contactin, tenascin-C és -R, axionin, és a HB-CAM molekulákhoz [61,62]. A glycolipidek és a CD44 [54] is a neurocan receptorai közé tartoznak. A neurocannak non-permisszív szerepét írták le a regeneráció során [56,63].

4.2.2.3. Brevican

A brevican is a hyaluronsav-kötő PG-ok közé tartozik, molekulásúlya 80-145 kDa körüli. Hasonlóan a többi lektikánhoz, a brevican is tartalmaz egy HA-kötő régiót, valamint EGF-szerű, CRP-szerű és lektin-szerű domént. A brevicant astrocyták és oligodendrocyták termelik [47,64], és kimutatták egyes idegsejtek körül [65]. A brevican receptorai a glycolipidek és a CD44

[54,66]. Az idegrendszer regenerációjában non-permisszív [56,63] egyes esetekben pedig permisszív szerepet tölt be [47,57,58].

4.2.2.4. Aggrecan

Az aggrecan molekulásúlya szövet típustól függően 1-3,5 MDa között változik, elektronmikroszkópos vizsgálattal kimutatták, hogy hossza elérheti a 100-300 nm-t is. Hyaluronsavval és link proteinjeivel akár 800 MDa-os aggregátumot is képezhet [67]. Az aggrecanban 3 globuláris domén (G1-3) van, melyek közül kettő (G1 és G2) a core protein N-terminális végén található. A C-terminális G3 domén aggrecanokkal és más ECM molekulákkal alakít ki kapcsolatot. A G2 és G3 domén közötti core protein szakaszhoz keratán-szulfátok (N-terminálishoz közelebb) és chondroitin-szulfát oldalláncok kapcsolódnak (C-terminálishoz közelebb) [68]. Az mRNS szinten történt vizsgálatok arra utalnak, hogy az aggrekant idegsejtek termelik [69], többek között egyes agykérgi és hippocampalis idegsejtek, illetve nagyobb mennyiségben motoneuronok. Receptorai közé tartoznak a glycolipidek, a tenascin-C és -R [70] és a CD44 [54,66]. Glikozilációjától függően permisszív illetve non-permisszív szerepet tölt be az idegrendszer regenerációjában [71,72].

4.2.2.5. Phosphacan

A **phosphacan** egy 173 kDa-os core proteinnel és három chondroitin-szulfát láncsal rendelkezik, és megtalálható a receptor típusú protein tirozin foszfatáz (RPTP ζ / β) extracelluláris doménjeként is [73]. A phosphacannak és a foszfatáznak az N-terminális végén karbo-anhidráz-szerű domén van, amelyet egy fibronectin III (fnIII) szekvencia követ. A foszfatáznak két cytoplasmatis katalitikus doménje és egy, extracelluláris a membránhoz közel elhelyezkedő szekvenciája is van, mely utóbbi alternatív splicing során törölődhet [74]. Az eddigi vizsgálatok azt mutatták ki, hogy a phosphacant az astroglia termeli [46,75]. A phosphacan eddig ismert receptorai a contactin (egy idegsejteken expresszáldó Ig adhézios molekula), az Nr-CAM [76] a tenascin-C és -R [62]. A phosphacan a többi CS-PG-hoz hasonlóan kapcsolódik lamininhoz, fibronectinhez, HA-hoz és kollagénekhez [51,68]. Az idegrendszer regenerációjában egyes esetekben permisszív [77], máskor non-permisszív szerepét mutatták ki [61].

4.2.3. Hyaluronsav

A hyaluronsav szerkezete. A GAG-ok közül a hyaluronsavnak (vagy hyaluronannak, HA-nak) van a legegyszerűbb szerkezete, az N-acetilglükózamin és a glükuronsav alternáló polimerjéből áll (2B. ábra). A többi GAG-tól eltérően a HA szintézise során nem kapcsolódik kovalensen egy PG core proteinjéhez, ezért fordul elő szabadon az ECM-ben. Egy HA molekulának akár 10 millió Da is lehet a molekulatömege, ami kb. 25 ezer diszacharidból alkotott láncot jelent, hossza elérheti a 25 μ m-t. A HA a polianionos karboxil csoportnak köszönhetően felcsavarodott, így a molekula nagy térfogat kitöltésére képes, emellett jelentős mennyiségű vizet és ionokat tud megkötni, fellazítva ezáltal a sejtek körüli ECM-ot [78]. Az aggregáccsal, versicáccsal és más PG-okkal makromolekuláris aggregátumokat hozhat létre. Jóllehet a HA kémiai szerkezete nagyon jól ismert és egyre több adat ismert a biológiai folyamatokban betöltött szerepéről [79], keveset tudunk arról, hogy az idegi regenerációra serkentő vagy gátló hatású.

A hyaluronsav szintézise. A HA molekulák eredete a központi idegrendszerben még nem ismert. Egyes vizsgálatok csirke embrió gerincevelőben hyaluronsav-szintáz 2 és 3 enzimet mutattak ki [80], illetve az NCBI EST adatbázisának expressziós profilra vonatkozó adatai szerint az emberi agyban megtalálható a hyaluronsav szintáz 1, 2 és a 3 is. Egyes adatok szerint a hyaluronsavat glia sejtek termelik [81]. A HA szintézise a sejtmembránban folyik egy membránhoz kötött protein által (ez a Has = hyaluronsav szintáz). A gerincesekben három izoenzimet (Has1, Has2, Has3) mutattak ki, amelyek mindegyike glikozil-transzferázként HA-t szintetizál, de eltérő enzimatiságokkal rendelkeznek a keletkező produktum mennyisére és a HA lánc hosszúságára nézve [82]. Mindhárom enzim cukoregységeket ad nucleotid precursorokból (UDP-derivátumokból) a HA lánchoz a membrán cytoplasmatis oldalán, majd a növekvő láncot továbbítja a pericelluláris térbe. A HAS aktivitása változik a sejt proliferációjának különböző fázisaiban, általában nő osztódáskor, és csökken sejtelhalás során [83]. **A HA lebontása** receptor mediálta endocytosisal és lizoszómális degradációval történik. A HA-CD44 kapcsolat mediálja a HA endocitotikus eltávolítását, mely folyamat a fejlődés kritikus szakaszainál történik. Az endocitózist követően a HA lizoszómákba kerül, melyek hyaluronidázt, β -glükuronidázt és β -N-acetilglükózaminidázt tartalmaznak [84]. A monoszacharidok ezután a citoszolba kerülnek, ahol a glükuronsav az ismert útvonalon bomlik le. Az N-acetilglükózamin foszforilálódik, majd deacetilálódik, a glükózamin-6-foszfát pedig fruktóz-6-foszfáttá deaminálódik, amely aztán a glükolízisbe kerül.

A HA receptorai, ligandjai. A hyaluronsav-kötő proteinek (HABP) két csoportját különböztetik meg, a csoportosítás a funkcionális szerep és a kapcsolat tulajdonságai alapján történik. Az első csoportba a HA-kötő strukturális molekulával rendelkező fehérjék, mint pl. a hyaluronectin, az aggrecan és a versican tartoznak, melyek a hyaluronsav egy decasaccharid részét ismerik fel [85]. Ide tartoznak még a heparán-szulfát PG-ok, melyek fontos szerepet töltenek be az idegsejtek és Schwann sejtek közötti kapcsolatok modulálásában, mely elsősorban fibronektineken és laminineken keresztül valósul meg és fokozza a neuritok növekedését [86]. A HA-kötő molekulák közé tartozik a GHAP (glial HA-binding protein) amely a versican N-terminális HA-kötő doménjének felel meg. A GHAP-t feltehetően a glia sejtek termelik, mivel a fehérállományban a GFAP-vel (glial fibrillar acid protein) kolokalizál. A második csoportba a sejt felszínhez kapcsolt HA receptorok tartoznak, amelyeket hyaladherineknak neveznek, amelyek egy HA hexaszacharidot ismernek fel [87]. Ide tartoznak a p125 (FAK), a p42/44 extracellular regulated kinase (Erk), a TSG-6, a brevican, a neurocan, a versican és a CD44, mely utóbbi membránhoz kötött és link modult tartalmaz. A HA kötésében fontos szerepet tölt be egy 9 aminosavból álló szekvencia is, amely megtalálható a RHAMM-ban (receptor for hyaluronan-mediated motility, CD168), az IHABP4-ban, az inter- α -tripszin inhibitor-ban, a CDC37-ben, és a fibroblast HA-kötő fehérjéiben [88]. A **CD44-HA** kapcsolat a következő intracelluláris jelátviteli folyamatokat befolyásolja: Rac, foszfoinozitid-3-kináz, Ras [89]. A **RHAMM**-nak elsősorban a sejt-migrációban, sejt-osztódásban és a sejt-traszformációban van fontos szerepe [90]. A receptor a mikrotubulusok, az aktin, a calmodulin és az extracellular regulated kinase (erk) kinázok segítségével fejt ki a fentebb leírt modulációs hatásait. A RHAMM-ot több idegsejt típusban és oligodendrocytában sikerült kimutatni, a patkány központi idegrendszerében heterogén eloszlást mutat. A fentiek alapján arra lehet következtetni, hogy a RHAMM és fő ligandja, a HA fontos szerepet játszik a központi idegrendszeri sejt-jelátvitelben és cytoszkeletális regulációban.

A HA szerepe. Az idegrendszer fejlődése során a HA fontos szerepet játszik az ECM és a sejt közötti kapcsolatban [38], ahol elsősorban a sejt proliferációt, transzformációt és a migrációt befolyásolja [91], részt vesz az intercelluláris kölcsönhatásokban és az intracelluláris jelátvitelben [79,88]. A HA felnőtt korban is jelen van az emlősök központi idegrendszerében [38,40,92], kimutatták a myelin-hüvelyben, a myelin és idegsejtek körüli pericelluláris mátrixban, [53], intracellulárisan az idegsejtek cytoplasmájában és a sejtmagokban [92]. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a HA-nak fontos szerepe lehet a postnatalis életben is. Egyes adatok szerint a HA-

nak a központi idegrendszer regenerációjában permisszív [93], míg más adatok szerint non-permisszív szerepe van [43].

4.2.4. Glycoproteinek

A fibronectin, a laminin, tenascin és egyéb nem-kollagén ECM proteinek különböző specilizált doménekkal rendelkeznek, így sejtfelszíni receptor kötőhelyekkel, illetve kollagénekhez, proteoglycanokhoz vagy más ECM molekulához való kapcsolódást segítő doménekkal. Ezen alegységek közül némelyik rövid aminosav szekvenciát tartalmaz. A glycoprotein molekulák egymáshoz diszulfid hidakon keresztül kapcsolódhatnak, így nagy méretű polimereket hoznak létre. Egyes fibronectin- vagy EGF-szerű aminosav ismétlődések eltérő variációja lehetővé teszi, hogy ezen molekulák más-más funkciót tölthessenek be. Ezen alcsoportok alternatív splicing és gén-duplikáció segítségével jöhetnek létre.

4.2.4.1. Fibronectin

A fibronectin szerkezete. A fibronectin egy olyan multifunkcionális fehérje, melyet több szövettípusban is kimutattak [94]. Mindössze egy gén kódolja a molekula aminosavait, különböző variánsai az mRNS alternatív splicing-jával jön létre. Ez a folyamat biztosítja a fibronectinek szövetspecifitását. A fibronectin két heparin-kötő doménból, három fibrin-kötő doménból, és egy központi doménból áll, amelynek RGD szekvenciájához történik a sejtek kapcsolódása [95]. Az alternatív splicing elsősorban az IIICS régióban történik, melynek a szövet-specifitásban van fontos szerepe (2C. ábra).

A fibronectin receptorai és ligandjai. A fibronectint legalább 6 különböző integrin receptor is felismeri. Az elsőként felismert integrin receptor az $\alpha_5\beta_1$ volt, melyet a klasszikus fibronectin receptorként ismerünk. Ezen a kapcsolaton keresztül képes befolyásolni a fibronectin a sejten belüli folyamatokat. Az $\alpha_5\beta_1$ receptor a fibronectin sejt-kötő RDG szekvenciájához kapcsolódik, az $\alpha_3\beta_1$ receptor pedig a lamininhez és a kollagénekhez kötődik [96].

A fibronectin előfordulása és szerepe. A fibronectin a központi idegrendszerben elsősorban olyan helyeken található meg, ahol intenzív axon növekedés van. In vitro vizsgálatok alapján elsősorban az idegsejtek adhesioját és az axonok növekedését serkenti [97]. A fibronectint az astrocyták expresszálják felnőtt korban, illetve átmenetileg a fejlődés során is [98]. A fibronectin „vezető” szerepet tölt be a perifériás idegek regenerációjában.

4.2.4.2. Laminin

A laminin szerkezete. A laminin több, általában három alegységből, hetero-trimer fehérjékből áll (2D. ábra). Ez utóbbiak az $\alpha\beta\gamma$ alegységek, (α 1-5, β 1-3, γ 1-3), melyek diszulfid hidakon keresztül kapcsolódnak, így a molekula elérheti akár az 1 millió Dalton méretet [99]. Eddigi ismereteink szerint 15 különböző laminin izoforma létezik [100]. A molekulának kereszt alakja van, a kereszt alapján egy nagyobb, míg a széleken kisebb globuláris alegységek találhatóak. A lamininek esetében az eltérő isoformákat közeli gének kódolják, így utólagos alternatív splicing nem történik. A három alegység közül az α alegység a legnagyobb, amely az egész molekula hosszán végig ér és a multiglobuláris heparint valamint a IV típusú kollagént kötő molekularészletben végződik. A kisebb β és γ alegységek diszulfid hidakon keresztül kapcsolódnak a felcsavarodott (coiled) α alegységhez, és ezen karokon több rövid peptid felismerő szekvencia található, melyek a laminin receptorokhoz való kötődést szolgálják.

A laminin receptorai és ligandjai. A laminin is több integrin receptor típushoz kötődik, így az $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ és $\alpha_v\beta_1$ receptorokhoz [96]. Az integrin receptorok a laminin α alegységének globuláris végéhez kötődnek, azonban ez a kötőhely rejtett pozícióban van, és csak akkor nyílik fel, amikor előzetesen a β láncon egy RGD szekvencia aktiválódik [101].

A laminin előfordulása és szerepe. A laminin-1 az a típus, amelyik a leggyakrabban fordul elő a központi idegrendszerben. A laminin-1-nek fontos szerepe van az idegsejt migrációban és az axon-növekedésben, és serkenti a sérült idegsejtek regenerációját is [102]. Részt vesz a szinapszisok formálásában, működtetésében illetve remodellingjében is [103].

4.2.4.3. Tenascin

A tenascin szerkezete. A tenascin egy nagyméretű glycoprotein, melynek öt ismert képviselője van. A tenascinok családjába a következő izoformák tartoznak: tenascin-C, -R, -X, -Y, -W [104]. Felépítésére jellemző, hogy az N-terminális végükön cisztein heptád ismétlődéseket, variábilis számú EGF-szerű (epidermal growth factor) ismétlődéseket és számtalan fibronectin-szerű (fn-III) ismétlődést tartalmaznak, melyek mind a multimerizációt szolgálják. A C-terminális végén a tenascinok homológiát mutatnak a fibrinogén β - és γ -láncával. A tenascin-C kezdetben egy trimer azonban két trimer összeolvadásából jön létre a hexamer, melyet diszulfid hidak stabilizálnak, azaz egy hatkarú csillaghoz (hexabrachion) hasonlít, melynek tömege eléri a 1,9 millió daltont [105] (2E. ábra). Minden tenascin molekula rendelkezik splice izoformákkal amelyek a fn-III domén sokszorozódásával jönnek létre.

A tenascin szintézise. A CSPG-kel szemben a tenascint érett és egyes éretlen gliasejtek termelik [52,81]. A fejlődés során elsősorban a határképleteket alkotó sejtekben expresszálódik.

A tenascin receptorai, ligandjai. A tenascin-C elsősorban integrin receptorokhoz ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_8\beta_1$ és $\alpha_9\beta_1$) kapcsolódik a harmadik fn-III doménen keresztül [106]. A glia eredetű phosphacan kapcsolatba lép a tenascin-C-vel, és komplexet alkot az extracelluláris térben. A phosphacanthoz nagyon hasonló a transzmembrán foszfortirozin-foszfataz β/ζ , mely lehetővé teszi, hogy a tenascin-C befolyásolni tudja a sejten belüli szignalizációs folyamatokat. A tenascin-R contactinhoz, versicanhoz és phosphacanthoz kapcsolódhat [107]. A tenascin-C és -R kapcsolatba lép a Na^+ csatornák β_2 alegységével is a myelinizált axonok Ranvier befűződéseinél.

A tenascin szerepe. A tenascin isoformák közül eddig a tenascin-C-t, -R-et és -Y-t mutatták ki a központi idegrendszerben, mely molekulák az idegrendszer fejlődésének különböző fázisaiban expresszálódnak, és a fejlődés befejeződésével szintjük csökken. [70]. Elsősorban az embrionális morfogenezisben mutatták ki fontos szerepét. Idegsérülést követően emelkedik a tenascin-C szintje, ezért azt feltételezik, hogy a tenascinoknak fontos szerepe van prekursor sejtek migrációjában, az axonok növekedésében illetve a guidance-ban.

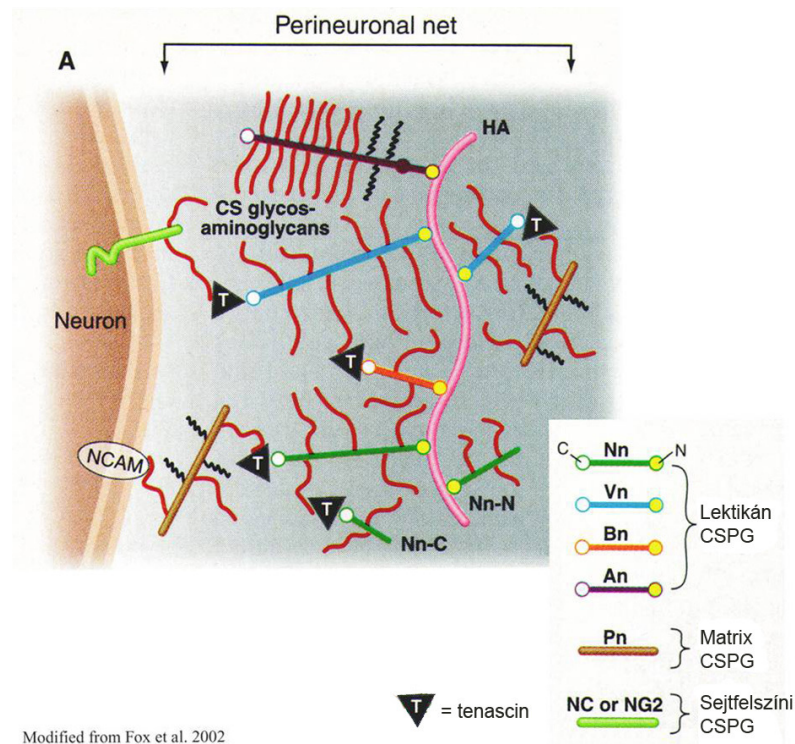
4.3. Az ECM makromolekuláinak specifikus szerveződése az idegrendszerben

Az ECM egyik jellegzetes előfordulási helye a neuronokat körülvevő **perineuronális háló** vagy **net (PN)**, a másik a perifériás és a központi idegrendszer határán lévő **tranzicionális zóna (TZ)**.

4.3.1. Perineuronal net (PN)

A PN egyes idegsejtek perikaryonját, axonjaik és nagyobb dendritjeik kezdeti szakaszait veszik körül [108,109], és ezen a háló-szerű struktúrán lyukakat találhatunk a szinapszisoknak megfelelően [108,110,111]. Már Golgi felismert a neuronok körül egy retikuláris struktúrát, azonban a későbbiekben ezt fixálási műterméknek vélték. Ezt követően majd csak Besta igazolta a PN létezését emlősökben, különböző élettani és morfológiai vizsgálatokkal, majd Rondinini mutatta ki kételtűekben és hüllőkben [112]. A hisztotechnikai módszerek fejlődésével párhuzamosan egyre több információ gyűlt össze a PN-ről [113,114]. Felépítésében több molekula is részt vesz, így a HA, chondroitin-szulfát PG-ok (CS-PG), és glycoproteinek [113-115], a versican, a tenascin, a phosphacan és a neurocan [73]. A PN alkotásában a HA, és a HA-

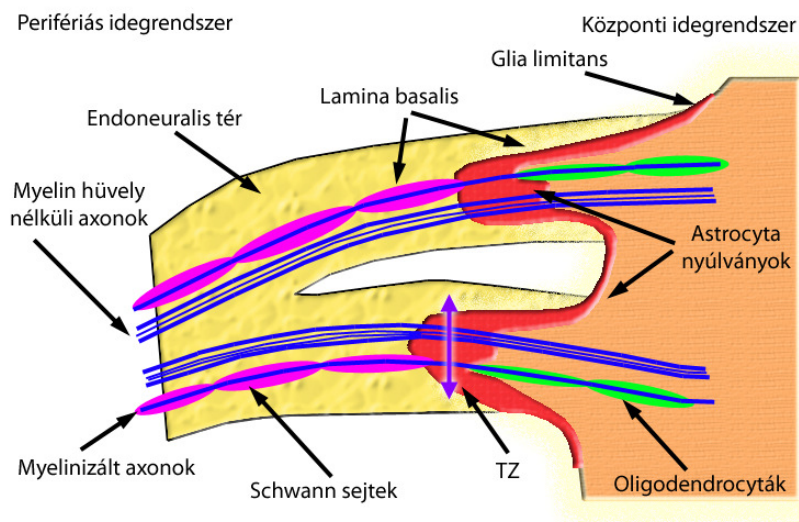
kötő PG-ok mellett a sejtfelszíni HA-receptorok is részt vesznek [116]. Korábbi kísérletekben kimutatták, hogy a különböző idegsejtek körül eltérő összetételű PN található [72] (3. ábra).



3. ábra. A perineuronal net szerkezete.

A PN az idegrendszer fejlődésének késői szakaszában jelenik meg, amikor a szinaptikus kapcsolatok már stabilizálódnak, az addig plasztikusnak mondható idegrendszerből egy restriktív környezet alakul ki. Mind az idegsejtek, mind az őket borító glia sejtek részt vesznek a PN termelésében [108]. Felnőtt állatokban a PN egyik feladata a szinaptikus kapcsolatok stabilizálása, a sejtek közötti kapcsolatok fenntartása és módosítása [110,111]. A látókéreg esetében a PN GAG tartalmának enzimatis degradációja után visszatér a látókéreg újszülöttre jellemző plaszticitása [115]. Emellett egyes növekedési faktorok koncentrációjának szinten tartásában [108], a polianionos mikro-környezet kialakításában [117], a hygroscópikus PG-ok segítségével pedig az extracelluláris tér nyitva tartásában van fontos szerepük [108]. A tenascin-R jelenléte, melynek non-permisszív hatása van az axonok növekedésére, megakadályozza újabb szinapszisok kialakulását felnőtt korban [118].

4.3.2. Transitionalis (TZ), átmeneti vagy belépési zóna



4. ábra. A belépési zóna szerkezete.

A központi idegrendszert az astrocyták által alkotott felszíni membrán borítja, amit glia limitansnak nevezzük. A perifériás idegek belépésénél a glia limitans megvastagodik, és ezen a területen mind a perifériás, mind a központi idegrendszerre jellemző myelin borítás megtalálható, ezért ezt a területet belépési vagy tranzicionális zónának (TZ) nevezzük. A belépési zóna területén éles határ figyelhető meg a szöveti szerkezetben. Ezen a részen a glia limitans-t alkotó astrocyták nyúlványainak külső plasmamembránja és az ehhez kapcsolódó membrana basalis alkotja a határt. A myelinizált rostokat a periférián a Schwann sejtek által alkotott myelin hüvely borítja, illetve emellett endoneurialis kötőszöveti mátrix fedi. Ez utóbbi alkotásában elsősorban kollagén rostok és fibroblastok vesznek részt [119]. A központi idegrendszerben a myelinhüvelyt az oligodendrociták nyúlványai alkotják, illetve köztük astrocyta nyúlványok és extracelluláris szöveti tér található. Az egyetlen struktúra, amely áthatol a belépési zónán csak az idegrost. A glia limitans-t kívülről borító lamina basalis ezen a területen a Schwann sejteket borító lamina basalisban folytatódik, ami később beborítja majd a myelinhüvelyes rostokat illetve a nem myelinizált rostkötegeket is, és így a membrana basalison nincsen megszakítás. Ennek köszönhetően a membrana basalis határrejteget képez az endoneurium extracelluláris tere és az idegi, illetve a gliális területek között (4. ábra).

A belépési zónában a fejlődés során a növekvő perifériás idegek átlépnek a glia limitanson. Csirke embriókban kimutatták, hogy a belépési zóna helye már a fejlődés korai

stádiumában determinált a velőcső epitheliumában. Ezen velősánc eredetű epithel sejtek már a fejlődés korai szakaszában egy ún. boundary caps (BC) struktúrát hoznak létre [120], amely majd szabályozza a sensoros axonkötegek benövését a központi idegrendszerbe [120]. A gerincvelői ventrális gyökereknél ez a struktúra nem található meg [121], itt valószínűleg chemoattraktív molekulák szerepelnek a motoros axonok növekedésének serkentésében.

A belépési zóna a szenzoros axonok regenerációja során barrierként szolgál, és a regeneráció hiányának oka a non-permisszív környezetben keresendő. E környezet kialakításában elsősorban ECM makromolekulák, illetve egyes gliasejtek által termelt faktor vesznek részt [122]. Az ECM molekulák jelenlétét csak az utóbbi időben sikerült kimutatni a TZ-ben, bár korábban már több tanulmányban is leírták e molekulák jelenlétét a perifériás idegek központi idegrendszerhez közeli területein [61,64]. Elsőként a tenascin (cytotactin) és a chondroitin-6-szulfát proteoglycan jelenlétét írták le, majd a HA kötő aggrecan és α -versican expresszióját tanulmányozták a TZ-ben [123]. A szenzoros idegek sérülését követően reaktív gliózis figyelhető meg, illetve az astrocyták is aktiválódnak, mely sejtek hyalektineket (brevican, neurocan és a versican V1 illetve V2 izoformáit) termelnek. Ezek a CS-PG molekulák is nagy mennyiségben találhatóak a TZ-ben, sőt sérülést követően szintjük patkányokban megemelkedik [124]. A laminin jelenlétét a TZ-ben elsősorban a perifériás idegek központi idegrendszerhez közeli részein elhelyezkedő Schwann sejtekhez asszociáltan sikerült kimutatni, de azokkal a Schwann sejtekkel amelyek már a központi idegrendszer területére benyúló szakaszon helyezkednek el, a laminin nem kolokalizál [125]. A hyaluronsav TZ-ben való jelenlétére eddig közvetlen utalást az irodalmi adatok nem szolgáltatnak, azonban több esetben is sikerült olyan mátrix makromolekulát kimutatni a TZ-ben, amely HA-kötő régióval rendelkezik [46,75,123].

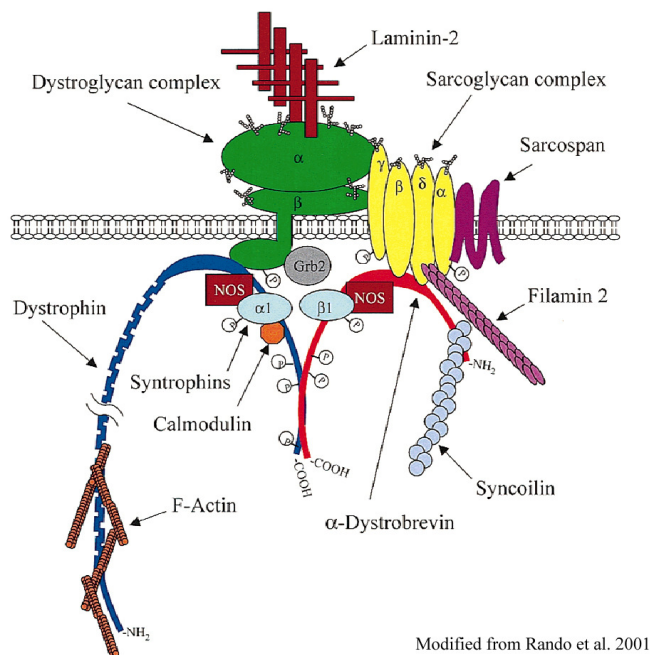
4.4. Az ECM molekulák receptorai

Az ECM és a sejtek közötti kommunikáció fenntartásában többféle molekulacsoport vesz részt, pl. integrin receptorok, caveolinok, és a dystrophin-glycoprotein complex (DGC) is, mely receptorokon keresztül az ECM makromolekulái fontos szerepet játszanak a sejten kívüli tér és a sejt belseje közötti kétirányú információ átadásban. A DGC előfordulását és jelentőségét a béka idegrendszerében még nem ismerjük, ezért tanulmányoztuk vizsgálatainkban e molekulakomplex egyes elemeinek eloszlását. Az integrin receptorok szerepéről pedig azért kell említést tenni, mert e receptorcsalád fontos az ECM és a sejtek közötti jelátvitelben.

4.4.1. A dystrophin-glycoprotein komplex (DGC)

4.4.1.1. A DGC szerkezete

A DGC elsősorban transzmembrán jelátviteli komplex, amely kapcsolatot létesít az extracelluláris és az intracelluláris tér között. Ennek következtében módosítja a sejtben belüli jelátviteli folyamatokat, melyen keresztül modulálhatja a transzkripciót is a magon belül, amely befolyásolja a sejt reakcióját az extracelluláris tér változásaira. Szinte minden sejt expresszálja a DGC valamely komponensét. A komplex alkotásában különböző molekulák vesznek részt. A komplex kapcsolódik az aktin cytoskeletonhoz, illetve az ECM-hez, annak is elsősorban a laminin, agrin és perlecan komponenseihez, ezáltal fontos szerepet tölt be a sejtmembrán integritásának fenntartásában [126,127]. Extracellulárisan a laminin-2 a dystroglycan komplexhez kötődik, melynek extracelluláris tagja az alfa-dystroglycan, míg transzmembrán tagja a beta-dystroglycan [126,128]. Ehhez kapcsolódik a négy transzmembrán alegységet tartalmazó sarcoglycan komplex, illetve ennek alfa alegységéhez kapcsolódik a sarcospan. A beta-dystroglycanhoz intracellulárisan kapcsolódik a dystrophin, ehhez pedig a syntrophin és dystrobrevin kapcsolódik, valamint két, jelátviteli mechanizmusokban szereplő molekula, a calmodulin és a nNOS is. Intracellulárisan a DGC cytoskeletális elemekhez is kapcsolódik, ezek az F-actin, filamin-2 és syncoilin (5. ábra).



5. ábra. A dystrophin-glycoprotein komplex szerkezete.

4.4.1.2. Dystrophinok

A dystrophinok membrán-asszociált aktin-kötő fehérjék, melyek jelentőségét muszkuláris disztrófiákban írták le először [129]. A betegség tünetei között megtalálhatóak kognitív és viselkedési zavarok, éppen ezért már korábban is feltételezték, hogy a molekulakomplexnek hatása van az idegsejtek működésére is [130]. A dystrophin családhhoz több molekula tartozik, úgy mint a dystrophin, utrophin, az alfa- és beta-dystrobrevin és a DRP2. A teljes hosszúságú dystrophin molekula 427 kDa molekulásúlyú, megtalálható a vázizmokban, szívizomban és az agy egyes területein [131]. A molekulát kódoló gén (DMD) az X kromoszómán található. Vannak kisebb molekulásúlyú isoformái is, ezek közül a Dp140 és a Dp71 elsősorban a központi idegrendszerben fordul elő, a Dp116 isoforma pedig a perifériás idegrendszerben található meg [132,133]. A Dp71 isoforma a leggyakrabban előforduló fehérje a DGC család tagjai közül az idegrendszerben [132,133]. Az utrophin, mely a dystrophin egy 396 kDa molekulásúlyú homológja több szövetben mutatható ki, mint a dystrophin. Az utrophin és a dystrophin közös homológ autoszómális részét dystrophin related proteinnek nevezzük (DRP).

In situ hibridizációs vizsgálatokkal több dystrophin isoformát is kimutattak a központi idegrendszerben, elsősorban a pyramis sejtekben és a Purkinje sejtekben [134], ahol azt találták, hogy a teljes méretű dystrophin (Dp427) csak az idegsejtekben található meg, míg a glia sejtekből teljesen hiányzik.

4.4.1.3. Dystroglycanok

A dystroglycant kódoló gén transzkripcióját követően egy 97 kDa-os fehérje keletkezik [126], amelyből később glikozilációval jön létre az alfa (156 kDa) és beta-dystroglycan (43 kDa) [128]. A dystroglycanokat epithel sejtek, neuronok és Schwann sejtek expresszálják [127,135]. A **beta-dystroglycan** C-terminális részéhez kapcsolódik a dystrophin és utrophin cystein gazdag régiója [136]. A beta-dystroglycan intracelluláris ligandjai a Dp116, a Dp71 [136] és az utrophin. A DGC beta-dystroglycanon keresztül kapcsolódik integrin-receptorokhoz is (indirekt kapcsolat). Ez utóbbi két proteinnek fontos szerepe van a neuromuszkuláris junkcióban a nikotinerger acetilcholin receptorok (nAChR) clusterizációjában, melyet elsősorban szimpatikus ganglionokban írtak le [137]. Ezen kívül a beta-dystroglycan kapcsolódik a growth factor receptor-bound protein 2-höz (Grb2) és e fehérjén keresztül befolyásolja a p125FAK aktivitását [138]. A beta-dystroglycanhoz kapcsolódhatnak protein-kinázok, így a dystroglycan ezen kapcsolaton keresztül szabályozza a jelátviteli folyamatokat [139].

Az **alfa-dystroglycan** megtalálható a cortex cerebri neuronjaiban, a hippocampusban, a bulbus olfactoriusban, a bazális ganglionokban, a thalamusban, és a hypothalamusban. Az agytörzsben és a kisagyban a neuronok sejtestjeiben és a nyúlványokban mutatható ki, illetve gliasejtekben. Az alfa-dystroglycanhoz, mely egy magasan glikozilált fehérje, extracellulárisan Ca-dependensen kapcsolódhat laminin-2 [126], agrin (neuromusculáris junkcióban), biglycan és perlecan.

A dystroglycanok kimutathatóak egyes szinapszisokban a posztzinaptikus membránban [138], és ezen a kapcsolaton keresztül képesek szabályozni a szinapszisok struktúrális és funkcionális szerveződését. Az agykéregben, a hippocampusban és a kisagyban dystroglycan kolokalizációt írtak le GABA_A pozitív receptorokkal [140], ahol feltehetőleg azok clusterizációjában vesznek részt.

Az ECM molekulák a dystroglycanhoz való kapcsolódásuk által képesek befolyásolni az extra- és intracelluláris folyamatokat, pl.: a beta-dystroglycan adhesio-mediálta foszforilációját fokozhatja a laminin még abban az esetben is, ha a laminin nem az alfa-dystroglycanhoz kötődik [139]. A laminin kötődése az extracelluláris α -dystroglycanhoz a β -dystroglycan C-terminális tirozin szekvenciájának a foszforilációjához vezet [139]. Ez az a foszforilációs lépés amelyen keresztül szabályozható a dystrophinok és az utrophin kapcsolódása a DGC-hez. A laminin fokozza a dystrophin-dystroglycan complex clusterizációját.

4.4.2. Integrin receptorok

Az ECM és a sejtek közötti kapcsolat fenntartásában fontos szerepet töltenek be az integrinek. Az integrinek transzmembrán proteinek, melyekben egy specifikus ECM protein-kötő tripeptid szekvencia (az Arg-Gly-Asp vagy az RDG) található. A sejt-mátrix kapcsolat specificitását az integrin kapcsolódás adja, ezen kívül a legtöbb adhézis mátrix molekula olyan kötőhelyeket is tartalmaz, ahol a PG-ok GAG oldalláncával tud interakcióba lépni.

Az integrin receptorok egy α , és egy β alegységből állnak [141]. Az α alegységek mindegyik receptornál megegyeznek, azonban a β alegység az egyes integrin alcsoportokban eltérhet. Mind a két alegység rendelkezik egy nagy méretű extracelluláris alegységgel, egy transzmembrán szakasszal és egy cytoplazmatikus farok résszel [142]. Az integrin receptor alegységek mérete 90 kDa-tól 200 kDa-ig változhat. Az α és a β alegység nem kovalensen, hanem divalens kationokon keresztül kapcsolódik egymáshoz. A ligand-kötő hely kialakításában mind a két alegység részt vesz, a cytoplazmatikus domén pedig a cytoskeleton egyes

komponenseivel képes interakcióba lépni a β alegység foszforilációján keresztül. Ezen a kapcsolaton keresztül alakul ki a cytoskeleton és az ECM közötti kapcsolat, és ezen át képes az ECM befolyásolni a sejtben végbemenő folyamatokat [94].

A központi idegrendszer ECM molekulái közül a fibronectinek, lamininek, különböző kollagének, tenascinok kötődnek az integrinekhez [141]. Hippocampus szeleteken végzett kísérletek arra utalnak, hogy az integrinhez kötődő fibronectin aktiválja az Src kinázt, ami foszforilálja az NMDA receptorokat, megnöveli aktivitásukat és ezáltal modulálja a szinaptikus választ. Az ECM-integrin kapcsolat által indukált jelátvitel másik targetje a citoskeleton közvetítésével a sejtmag, ahol a génexpresszió befolyásolásán keresztül módosíthatja a neuronok membránjának receptor összetételét. A sejt aktivitásának megváltozása, ami például a vestibuláris neuronok deafferentációja során történik, olyan intracelluláris folyamatokat indíthat el, aminek következtében megváltozik az integrin konformációja és ezáltal az integrin aktiválódása következik be [143].

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

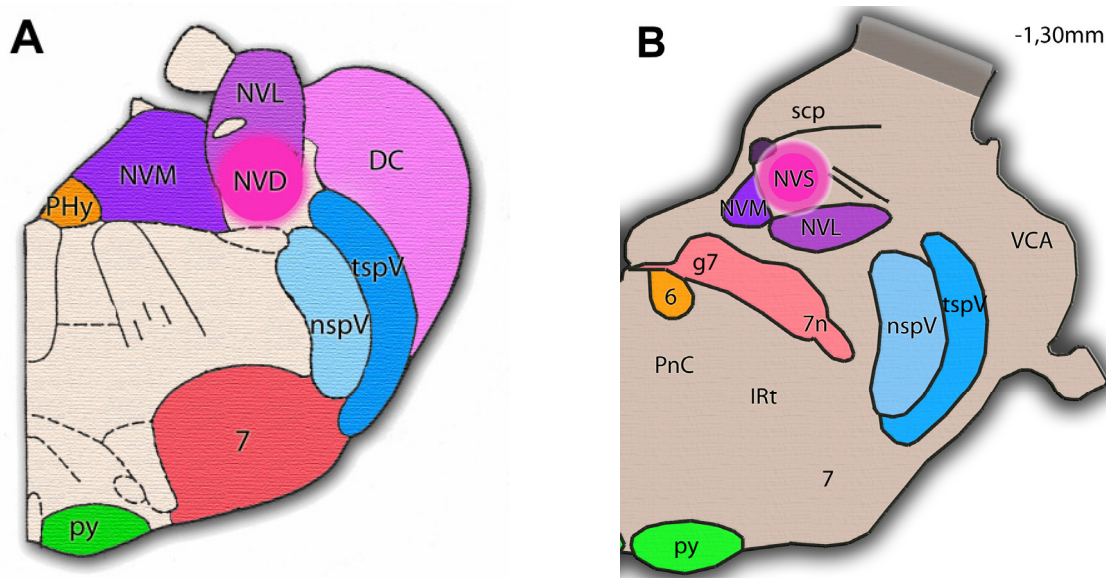
5.1 Kísérleti állatok, a kísérletekhez szükséges engedélyek és a kísérleti állatok altatása

A vestibuláris magok kapcsolatainak feltérképezéséhez felnőtt Wistar patkányokat használtunk, melyek súlya 250-300 gramm, életkoruk 4-5 hónap volt. A felnőtt patkányok altatásához uretánt alkalmaztunk (10%-os, 1,3 ml/testsúly kg), melyet intraperitoneálisan fecskendeztünk be.

Az ECM molekulák és feltételezett receptorának, a DGC eloszlásának vizsgálatához, valamint a nervus vestibulocochlearis regenerációjának tanulmányozásához kecskebékákat (*Rana esculenta*) használtunk. A felnőtt állatok megközelítőleg azonos súlyúak és méretűek voltak. Altatásukhoz tricain-metan sulfonát-ot MS-222-t (0,1% 3-aminobenzoic acid etil-észterrel, Sigma) alkalmaztunk, melyet a békák hátára helyeztünk.

Az állatkísérletek végzéséhez az adott időszakban érvényes egyetemi engedéllyel (eng. szám: 22/2001 DE MÁB) rendelkezünk.

5.2. Pályakövetéses módszerek



6. ábra. A neurobiotin injekció helye a nucleus vestibularis descendensben (A) és a PHA-L injekció helye a nucleus vestibularis superiorban (B) a Paxinos és Watson (1998) által szerkesztett atlasz alapján.

5.2.1 Neurobiotinnal történő pályakövetéses vizsgálatok

Kísérleteinkben hat felnőtt patkányt használtunk, altatást követően az állatok fejét stereotaxiás készülékben rögzítettük. A fej rögzítése három ponton történt: a két külső hallójáratban hegyes végű fémrudakkal a dobhártyát átszakítva, illetve a metszőfogakra akasztott fémhurok segítségével rögzítettük az orrcsontot. A fejtető bőrén sagittalis metszést ejtettünk, a frontalis, temporalis és occipitalis koponyacsontokat szabaddá tettük az ott tapadó izmoktól és a periosteumtól. A koponyát operációs mikroszkóp alatt, fogászati fűrő segítségével megnyitottuk, a megnyitás és az injektálás helyét Paxinos és Watson [144], által szerkesztett atlaszban megadott sztereotaxikus koordináták alapján állapítottuk meg (6A. ábra). Ezt követően mikroszkóp alatt átvágtuk az agyburkokat és felszívott jelölőanyagot (5%-os neurobiotin (NB), Vector) 0.5M Tris pufferben oldva, pH 7.4) tartalmazó üveg mikroelektrodát (átmérője 10-15 μm) az agytörzs dorsomedialis részén elhelyezkedő NVD-be injektáltuk. Az injektálás egyenárammal történt, 20 percig szakaszosan (5 μA áramerősséggel 7 másodperc injektálás, amit 3 másodperc szünet intervallum követett). A neurobiotin diffúziója az injekciós helytől kicsi, kb. 200 μm , így alkalmas a beadás helyén található neuronok anterográd jelölésére. Mivel a jelölőanyagot az axonvégződés is felveszi, így a sejtek retrográd megjelölése is lehetővé válik.

Az állatokat 7-14 nap után intraperitonealisan adott uretánnal újra elaltattuk, és transcardialis perfúzióval fixáltunk. Ennek során először fiziológias sóoldattal kimostuk a vért, majd fixáló oldatot (amely 1.25 % glutáraldehid, 2 % paraformaldehid, 0.1M foszfátpuffer, pH 7.4 összetételű volt) áramoltattunk át a keringési rendszeren. A fixálást követően az állatok gerincvelőjét és agyvelőjét kipreparáltuk és az eltávolított preparátumot egy éjszakán át a fixálóval azonos összetételű oldatban inkubáltuk 4 °C-on. 10% illetve 20%-os szukrózzal történő feltárást követően a blokkokat folyékony nitrogénben fagyasztottuk majd 60 μm vastag frontális metszeteket készítettünk fagyasztó mikrotómmal. A metszeteket 0.1M-os (pH7.4) foszfát pufferben tároltuk, illetve blokkoltuk az endogén peroxidáz aktivitást 10%-os metanolt és 1%-os hidrogénperoxidot tartalmazó 0.1M-os (pH 7.4) foszfát pufferben 10 percig történő inkubálással. Ezt követően 0.6%-os Triton X-100 0.1M-os (pH 7.4) foszfát puffer oldatával kezeltük a metszeteket. A jelölést avidin-biotin komplex (ABC) illetve Ni-DAB reakcióval tettük láthatóvá, majd a metszeteket zselatinos vagy szilanizált tárgylemezre vittük és felszálló alkoholsorral víztelenítést végeztünk. Háttérfestésként 1 %-os toluidinkék vizes oldatát használtuk.

A metszetekből Neurolucida (MicroBrightField Inc.) illetve camera lucida segítségével rekonstruáltuk a retrográd jelölődött sejteket és az axonterminálisokat. A Neurolucida software

alkalmazásával minden jelölt képlet 3 dimenzióban is megjeleníthető. A jelölt sejtekről és végződésekről Nikon Eclipse 800 fénymikroszkóp segítségével mikroszkópos felvételeket készítettünk.

5.2.2. Phaseolus vulgaris-leukoagglutinin (PHA-L) történő elektronmikroszkópos vizsgálatok

A vestibuláris magok kapcsolatainak ultrastrukturális vizsgálatára a Gerfen és Sawchenko [145] által 1984-ben először alkalmazott jelölőanyagot, egy növényi fehérjét, a Phaseolus vulgaris – leukoagglutinin (PHA-L) használtuk. A neurobiotin jelölésnél leírtak szerint az állatok fején az altatást követően nyílást készítettünk melynek pontos helyét a Paxinos és Watson (1998) által készített sztereotaxiás atlasz segítségével határoztuk meg (6B. ábra). A jelölőanyagot tartalmazó oldatot (2,5% PHA-L 0,05M TBS-ben /Tris Buffer Saline/, pH 7.4) 10-15 μ m csúcsátmérőjű üvegelektroda segítségével injektáltuk a NVS-be. Az injektálás iontoforézissel történt, pulzáló (7s injektálás, 3s szünet) 5 μ A áramerősséget használva 10 percen keresztül. A PHA-L naponta 4-5 mm-t transzportálódik az axonokban, ezért 14 napos túlélést követően az állatokat újra elaltattuk és transzkardiálisan perfundáltuk fiziológias sóoldattal 2-3 percig, majd fixáló oldattal (amely 2,5% glutáraldehydet, 0,5% paraformaldehydet, és 0,2% picrinsavat tartalmazó 0,1M-os foszfát puffer /PB/ volt) 20-25 percig. Ezt követően a diencephalont, az agytörzset és a gerincvelőt eltávolítottuk és a fixálóval hasonló összetételű oldatba helyeztük egy éjszakára. A vizsgálni kívánt blokkokat 0,1M-os PB-ben 1 óráig mostuk, majd ezt követően 60 μ m-es metszeteket készítettünk vibratómmal, melyeket 0,1M-os PB-ben gyűjtöttünk össze.

A metszetek közül a mesencephalont tartalmazók kerültek további feldolgozásra. Normál kecske szérummal (NGS) történt 50 perces blokkolás után (0,05M-os TBS-ben oldva) 0,05M-os TBS 1% NGS-ot tartalmazó oldatában feloldott biotinizált kecske-anti-PHA-L-al (Vector 1:2000) inkubáltuk a metszeteket 4°C-on 2 napig, majd a mosást követően (0,05M TBS 1% NGS) ABC-t kapcsoltunk (Vector, 1:100) a már meglévő fehérje-antitest struktúrához (4 óra szobahőn). Az immunreakciót DAB kromogén reakcióval tettük láthatóvá. A metszeteket 1%-os osmium-tetroxiddal (OsO_4) kezeltük (40 perc), majd 0,1M-os PB-ben mostuk 1 órán keresztül. A metszeteket zselatinos vagy szilanizált tárgylemezekre helyeztük és lefedtük őket. A kiválasztott metszetekből a nucleus oculomotorius és a nucleus rubert tartalmazó részleteket kivágtuk majd alkoholos dehidrációt és propilén oxidban történt inkubálást követően Durkupan ACM (Fluka) műgyantába ágyaztuk. A polimerizáció után félvékony (0,5 μ m) metszeteket majd pedig

ultravékony (60 nm) sorozatmetszeteket készítettünk, melyeket Formvar-coated nikkel gridre gyűjtöttünk. Ezt követően a sorozatmetszetek közül minden másodikat 1%-os perjódssavval (REANAL) kezeltük, amely a gyanta polimer keresztkötéseit fellazítja, megkönnyítve ezzel az antitest szövetbe történő átdiffundálását. A desztillált vizes mosást követően 5%-os Na-metaperjódáttal (SIGMA) történő inkubálás eltávolítja az ozmiumot a metszetekből, megakadályozva ezzel az aspecifikus reakció kialakulását. A PBST-ben történő mosás után 1%-os Bovine serum albumin-nal (BSA) blokkoltuk (BSA 0,01M-os PBST-ben oldva). Ezt desztillált vizes, majd PBST-ben történt mosás követte. A neuronális jelölőanyaggal (PHA-L) azonosított terminálisokban feltételezett gátló neurotranszmitter kimutatása a következő módon történt: terminálisok γ -amino-vajsav (GABA), tartalmát az adott neurotranszmitter ellen termelt anti-GABA (1:1000, SIGMA) felhasználásával határoztuk meg. Az antitestet nyúlban termeltették. A sorozatmetszetek első tagjait 0,01M-os PBST-ben mostuk, majd 1%-os Bovine serum albuminban inkubáltuk. A PBST-vel /PBS+Triton/ és a TBST-vel /Tris (pH 8.2) + 0,1% Triton/ történt mosás után a fehérje-antitest komplexhez olyan szekunder antitestet kapcsoltunk (immunogold-dal konjugált kecske anti-nyúl IgG 1:20-as hígítás TBST-ben oldva) melyhez 20 nm-es aranszemcse volt kötve, s így alkalmassá vált elektronmikroszkópos vizsgálatra. A desztillált vizes mosásokat követően először uranil-acetáttal, majd újabb mosás után ólom-citráttal kontrasztoltunk.

A jelölt terminálisokról Jeol 1010 elektronmikroszkóp segítségével készítettünk felvételeket.

5.3 Az extracelluláris mátrix makromolekuláinak illetve feltételezett receptorainak kimutatása béka idegrendszerében

Az altatást követően az állatokat transcardialisan perfundáltunk izotóniás sóoldattal. Az eltávolított gerincvelőt és agyat a spinalis és cranialis idegek kezdeti szakaszával együtt Sainte Marie fixáló oldatba (99% abszolút alkohol, 1% 96%-os ecetsav) helyeztük. A kivett készítményeket paraffinba ágyaztuk, majd 10 μ m vastag horizontális és keresztmetszeteket készítettünk. Deparaffinálást követően a metszeteket először 2%-os hidrogén-peroxidban majd 1%-os bovine serum albuminnal (BSA) inkubáltuk 30-30 percig.

5.3.1. Az extracellularis matrix makromolekulák kimutatása

A hyaluronsav detektálásához egy specifikus biotinilált hyaluronsav-kötő próbát (bHABC) (R.Tammi és M.Tammi jóvoltából a Kuopioi Egyetem Anatómiai Intézetéből kaptuk) használtunk [44]. mely az aggregált hyaluronsav-kötő egységhez kapcsolt biotin molekulából áll, így lehetőséget ad a poliszacharid hyaluronsav kimutatására. A próbát 1:10 hígításban használtuk (PBS-ben oldva), majd avidin-biotin (ABC) komplex és DAB segítségével vizualizáltuk a reakciót. Negatív kontrollként olyan metszeteket használtunk, amelyeket vagy nem inkubáltunk bHABC-vel vagy pedig a bHABC-vel való inkubálás előtt *Streptomyces* hyaluronidázzal (Calbiochem), melynek végső koncentrációja 4 mg/ml volt, egy éjszakán át előemésztettünk. Pozitív kontrollként béka sternum porcot használtunk [146].

A többi extracelluláris mátrix molekula kimutatásához a következő primer antitesteket használtuk: anti-humán tenascin-C (1:4000 hígítás, Sigma), anti-csírke phosphacan (1:40, Sigma), anti-humán fibronectin (1:400, Sigma) és anti-egér laminin (1:200, Sigma). A primer antitesttel való inkubálást követően a metszeteket PBS-ben mostuk, majd megfelelő specifikus biotinilált szekunder antitestekkel 2 órán át szobahőn inkubáltuk. Az immunreakciókat a HA-próba kimutatásához hasonlóan vizualizáltuk. Negatív kontrollként a primer antitestekkel nem kezelt metszeteket használtuk. Laminin, tenascin C és fibronectin esetén pozitív kontrollként a béka veséből készült metszetek szolgáltak, míg a phosphacan pozitív kontrolljaként a patkány és béka kisagyból készült metszeteket használtuk.

5.3.2. DGC molekulák (az ECM egyik feltételezett receptorának) kimutatása

A metszeteket a következő primer és szekunder antitestekkel inkubáltuk: primer antitestként egér-anti-dystrophin (Dys2, Novocastra 1:25 PBS-ben) majd szekunder antitestként biotinilált kecske-anti-egér IgG (1:500 PBS-ben) illetve primer antitestként nyúl-anti-beta-dystroglycan (BDG, Novocastra, 1:200 PBS-ben) majd szekunder antitestként biotinilált kecske-anti-nyúl IgG (1:500 PBS-ben). A primer antitestekkel egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk a metszeteket majd a szekunder antitestekkel 2 órán át szobahőn inkubáltunk. Az immunreakciót extravidinnel és DAB kromogén segítségével vizualizáltuk. A Dys2 antitest 427 kDa-os, a 260 kDa-os, a 116 kDa-os és a 71 kDa *dystrophin* variánsait mutatja ki. Negatív kontrollként a primer antitesttel nem kezelt metszeteket használtuk, míg pozitív kontrollként béka szívizomzatból készült metszeteket alkalmaztunk [147]. Fluorescens és konfokális pásztázó lézer mikroszkópos vizsgálatokhoz a következő szekunder antitesteket használtuk: az anti-dystrophin kimutatásához

Cy3-kapcsolt anti-egér-IgG-t, az anti-BDG kimutatásához pedig FITC-konjugált anti-nyúl-IgG-t használtunk. A fluorescens-jelölt szekunder antitestek használatával tudtuk vizsgálni két molekula koálokalizációját. A sejtmagok festésére DAPI-t (Boeringher) használtunk.

5.4. A nervus vestibuláris regenerációjának vizsgálata

A vestibularis ideg átvágásához a békák agytörzsét ventrális irányból tártuk fel, úgy, hogy a szájnyálkahártyán metszést ejtettünk majd az agytörzset ventralisan borító porcos koponyarészletet eltávolítottuk. A VIII. agyideget feltártuk majd az agytörzsbe történő belépésétől kb. 1mm-re distálisan, de a ganglion vestibulare-től mediálisan átvágtuk (postganglionáris axotómia). Az átvágott idegvégeket egymás mellé helyeztük majd a nyálkahártyát összevartuk. Az állatok a műtétet követően 3 naptól 12 hétig kb. 10°C-on tartottuk, a tároló-dobozokban a vizet naponta cseréltük. Vizsgálatainkhoz 51 kecskebékát használtunk, melyek közül 7 a műtétet követően elpusztult. A HA és a laminin eloszlás-változásának vizsgálatához 32 békát használtunk fel időpontonként 3-3 állatot, a 3 és az 5 napos túlélés kivételével, ahol 5 illetve 6 békát használtunk.

A 3 naptól 84 napig (12 hétig) tartó intervallumban az állatokat újra elaltattuk, majd transcardialisan fiziológiás sóoldattal perfundáltuk és eltávolítottuk az agytörzset a VIII. agyideg megfelelő részével együtt. A kivett preparátumokat Sainte Marie fixáló oldatba helyeztük és 10 µm vastag paraffinos metszeteken a korábban már leírt módon vizsgáltuk a bHABC reakciót, illetve a laminin immunreakciót. Minden egyes tárgylemez egy postoperatív időhöz tartozó, egy állatból származó metszeteket, illetve egy nem operált, kontroll állatból származó metszeteket tartalmazott. Átlagosan egy postoperatív időponthoz 3 tárgylemez tartozott, és az összes tárgylemezt egyszerre inkubáltuk azonos ideig.

Vestibuláris axotómiát követő axon-regeneráció NB jelöléses vizsgálatához 12 operált békát használtunk. Annak bizonyítására, hogy a regeneráció valóban megtörtént, a regeneráció befejeződésének feltételezett időpontjában (8. postoperatív héten) altatást követően a korábbi axotómiától distálisan az ideget átvágtuk, és az átvágott idegvégekre neurobiotin kristályokat helyeztünk. 7 napos túlélés után a neurobiotinos pályakövetéses módszereknél leírt módon fixáltuk az állatokat és a jelölődött rostokat vizualizáltuk.

5.4.1. Quantitatív vizsgálatok

5.4.1.1. Optikai denzitás mérés

A VIII. agyideg regenerációja során bekövetkező hyaluronsav eloszlási mintázat változás kvantitatív analíziséhez minden metszetről Nikon Eclipse 800 transzmissziós fénymikroszkóppal felvételt készítettünk, az ép (contralateralis) és az operált (ipsilateralis) oldalról külön-külön. A felvételek készítésekor a mikroszkóp beállításait nem változtattuk meg, minden felvétel azonos fényerő mellett, azonos szűrőkkel és azonos apertúra beállításokkal készült. A képeket CCD kamerával rögzítettük Spot (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) software segítségével és nem tömörített formátumban (tiff uncompressed) mentettük el, illetve semmilyen utólagos kontraszt és fényerő változtatást nem alkalmaztunk rajtuk. A képeket 8 bites (256 szürkeárnyalatos) formátumban mentettük el. Az optikai denzitást Image J (National Institutes of Health, Bethesda) software segítségével mértük mind az operált, mind az ép oldalon a belépési zóna (TZ), a mediális (NVM) és laterális (NVL) vestibularis mag területén, illetve referenciaként a tractus solitariusban. A szoftver kiszámította a különböző színű pixelek eloszlását a 256 szürkeárnyalatos skálán. A mért adatokat (átlagos denzitás, mért terület pixel száma) MS Excel fileban mentettük el, és ezeket a későbbiekben statisztikai módszerekkel hasonlítottunk össze.

5.4.1.2. Statisztikai vizsgálatok

Statisztikai elemzésünk kezdetén ellenőriztük, hogy az agytörzs egy adott magjának mérhető HA reakció intenzitásában megfigyelhető-e szignifikáns variabilitás ha i) az intenzitást egyetlen állatból származó, de a mag különböző magasságú horizontális metszeteiből ii) különböző állatokból vett metszeteken mértük. Ehhez a vizsgálathoz a tractus solitarius HA reakciójának intenzitását mértük, mivel ez a struktúra a horizontális metszeteken jól azonosítható és meglehetősen nagyméretű homogén struktúra. Ehhez a vizsgálathoz 5 normál felnőtt állatból származó, a HA kimutatásánál leírt módszerrel készített metszeteket használtunk. Állatonként 6-8 metszetet használtunk, és az egy állatból származó metszeteket egy tárgylemezen inkubáltuk. Két-tényezős ANOVA teszttel nem találtunk szignifikáns különbséget a HA reakció intenzitásában sem az azonos állatból származó metszetek között ($p > 0,29$), sem a különböző állatok között ($p > 0,34$). Ezért a későbbiekben a belépési zóna és a vestibularis magvak vizsgálatakor *nem tettünk különbséget* az egy állatból származó adott struktúrát tartalmazó *különböző metszetek között*, illetve a *különböző állatokból* származó identikus struktúrákat tartalmazó metszetek között.

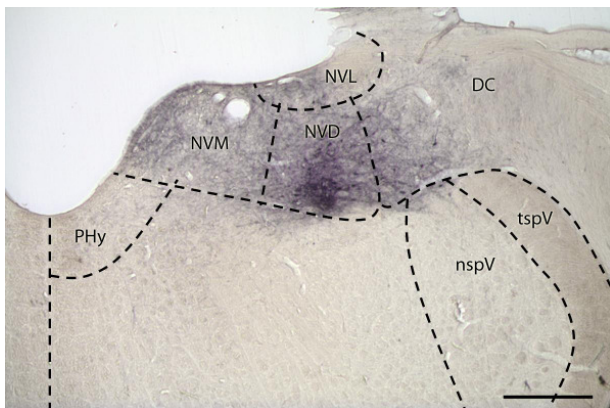
A HA reakció intenzitását a különböző postoperatív napokon két-mintás t-próbával hasonlítottuk össze. Az intenzitás változások tendenciáját a lineáris regressziós egyenesek meredekségének tesztelésével vizsgáltuk, míg az ép és az operált oldalak közötti HA denzitás változások lehetséges összefüggéseit Fisher-féle exact teszttel vizsgáltuk. A statisztikai vizsgálatokhoz MS Excel és GraphPad szoftvereket használtunk.

Az általunk vizsgált területen (ROI = region of interest) a mikroszkópos felvételek különböző színű pixeljeinek az előfordulásuk gyakoriságával súlyozott átlagával definiáltuk a reakció intenzitását az adott struktúrában. Az általunk használt Image J szofver a 0-255 közötti színskálán a legkisebb reakció intenzitásnak megfelelő, legvilágosabb színnek a 255, míg a legnagyobb reakció intenzitásnak megfelelő, legsötétebb színnek a 0 értéket adta, és kiszámolta az egyes színárnyalathoz tartozó pixelek számát. A különböző túlélési időhöz tartozóan az egyes struktúrák HA reakció intenzitásának összehasonlításához, illetve a változások várható irányának teszteléséhez a reakció intenzitás-értékeinek normalizálására volt szükség, melyet nem operált felnőtt állatból (kontroll állat) származó metszeteken az azonos struktúrából mért intenzitások átlagának segítségével végeztünk el. A kontroll állatból készült metszeteket az operált állatokból vett metszetekkel egy tárgylemezen inkubáltuk.

Az adatok normál eloszlását két kritérium szerint teszteltük: (1) $0,9 < \text{median/mean} < 1,1$ és (2) $3 \cdot \text{standard deviáció} < \text{mean}$. A varianciák egyenlőségét (equality of variances) F-teszt segítségével ellenőriztük [148].

6. EREDMÉNYEK

6.1. A nucleus vestibularis descendens kapcsolatainak vizsgálata patkányban



7. ábra. Mikroszkópos felvétel az injekció helyéről.

Lépték: 200µm

A metszetek vizsgálatát a neurobiotin injekció helyének ellenőrzésével kezdtük. Az elektródából kijutó jelölőanyag kb. 200 µm távolságra diffundál, az előhívott neurobiotin fekete színben válik láthatóvá egy hasonló átmérőjű kör alakú területen (7 ábra). Az axonok, végződéseik és a sejtek is fekete színben jelentek meg. Vizsgálatainkban a neurobiotin injekció helyét minden esetben a NVD rostrális részében találtuk.

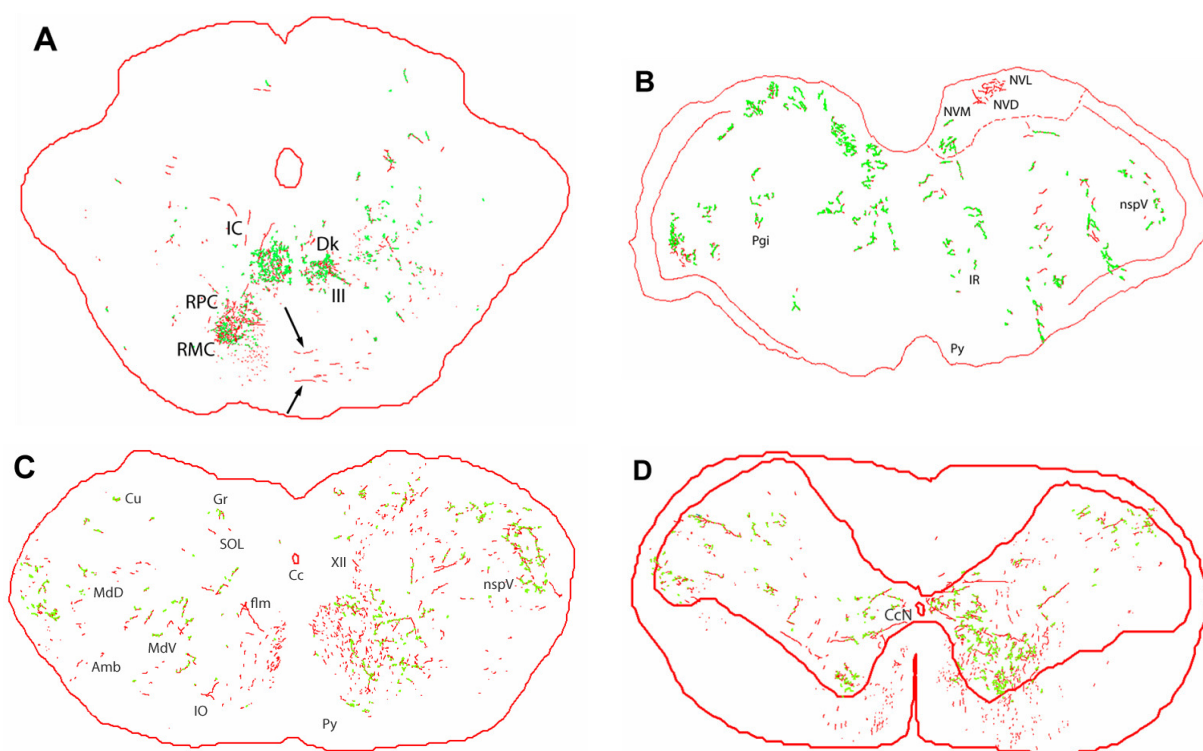
6.1.1. Anterográd projekció

Az injekció helyétől az anterográd jelölődött rostokat és végződéseket rostrális és caudalis irányba tudtuk követni. A legrostrálisabb axonokat és végződéseket a **diencephalon** területén találtuk elsősorban az azonos oldalon. Összehasonlítva az agytörzsi vetülettel, jóval kevesebb rostot tudunk követni a diencephalon területére. A végződési területek az azonos oldali thalamus nucleus ventralis posteromedialisában voltak, valamint a zona incerta területén.

A **mesencephalon** területét a NVD rostjai a FLM-ban haladva érik el. A basis mesencephali területén a rostok kisebbik része az ellenoldalra kereszteződik, nagyobbik része azonos oldalon a mesencephalon különböző struktúráiban végződik (8A. ábra). Ezek közül a verticalis szemmozgások koordinálásáért felelős nucleus Darkschewitch és nucleus interstitialis Cajal ellenoldali dominanciával tartalmazta a legtöbb végződést. Az oculomotorius és trochlearis magban mindkét oldalon megtalálhatók a NVD eredetű terminalisok (9A. ábra). Az injekcióval ellentétes oldalon gazdag terminalis terület figyelhető meg a nucleus ruber parvocellularis és magnocellularis részében (9B. ábra).

A **híd** magasságában a NVD igen erőteljes projekcióval rendelkezik (8B. ábra). Az ipsilateralis rostok legnagyobb mennyiségben az injekció helyétől rostrális és caudalis irányban haladva az azonos oldali NVM, NVL NVS területére követhetők, ahol gazdag terminalis

hálózatot alakítanak ki. Ezeket a rostokat, amelyek az azonos oldali vestibularis magok között létesítenek kapcsolatot, intrinsic összeköttetéseknek nevezik. Az azonos oldalon haladó rostok másik csoportja a nucleus tractus spinalis nervi trigeminiben (nspV) végződik, a nervus mandibularis projekciós területének megfelelően (9C. ábra). A medialis irányba haladó rostok egy része a nervus facialis térdétől rostralisan haladva éri el az azonos oldali abducens magot, ahol a sűrű terminalis hálózat mintegy körberajzolja a mag kontúrját (9D. ábra). A formatio reticularis területén elsősorban a paragigantocellularis és az intermedier magokban találtunk végződéseket. Az injekció területéről nagyszámú un. commissuralis rost követhető az ellenoldali NVS, NVM, NVL ÉS NVD területére (9E. ábra).

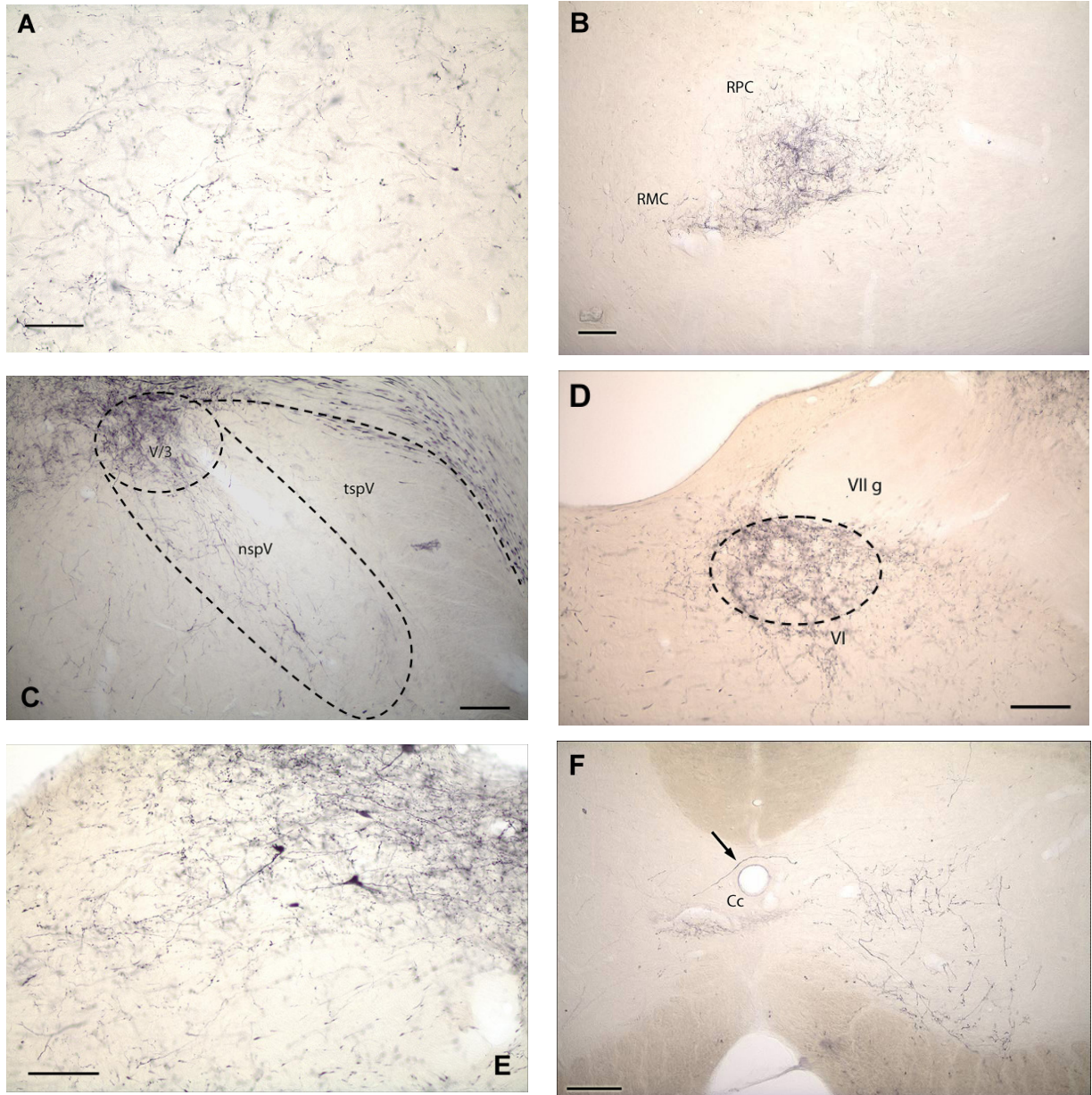


8. ábra. Vázlatos rajzok a mesencephalon (A), a pons (B), a nyúltvelő (C) és a cervicalis gerincvelő (D) területéről. Piros színnel a neurobiotin jelölt rostokat, zöld színnel a terminálisokat jelöltük.

Az injekcióval ellentétes oldalon az abducens mag jóval kevesebb végződést tartalmaz, mint az azonos oldali, és kevés rost végződik az ellenoldali nspV-ben is. Az ellenoldali formatio reticularis végződési területe hasonló az azonos oldalihoz.

A NVD-ből eredő, caudalis irányban haladó rostok a FLM-ban találhatók. Ebből válnak le azok a rostok, amelyek a **nyúltvelő** következő területein végződnek: nucleus gracilis és cuneatus, a nspV, a nucleus tractus solitarii, a nucleus prepositus hypoglossi, formatio reticularis ventralis

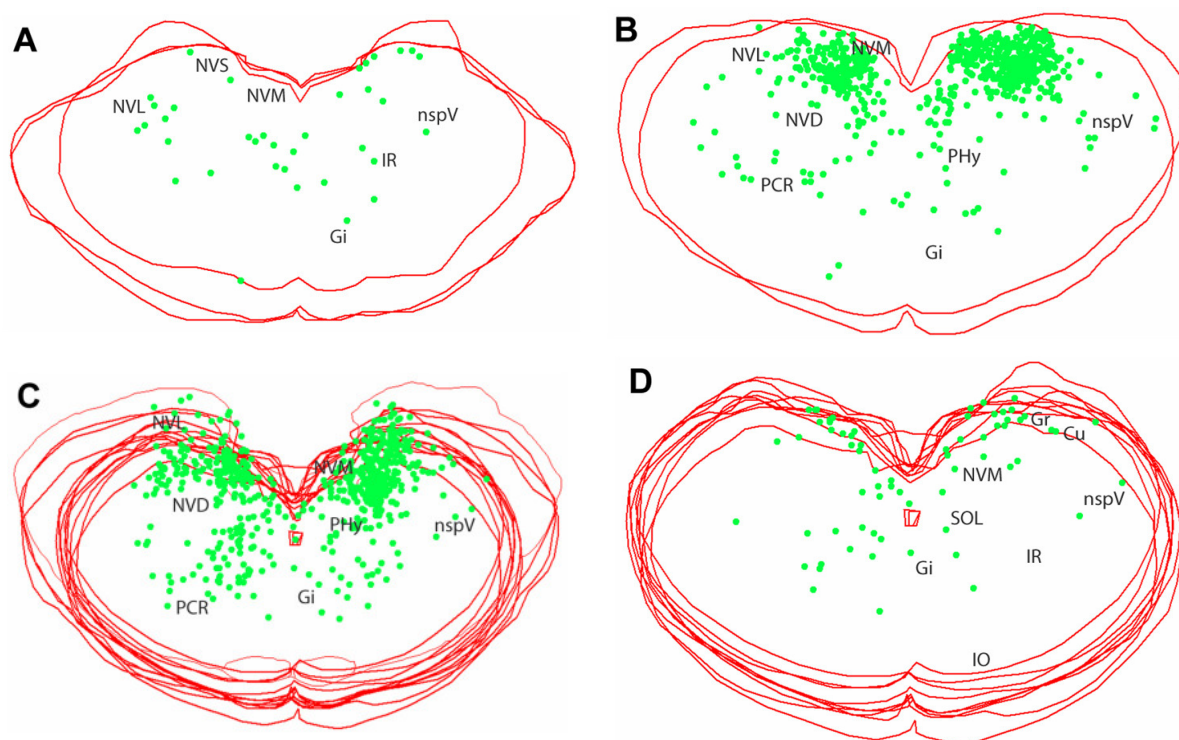
és dorsalis részében. A nyúltvelő területén megtaláljuk a NVM és NVD legcaudalisabb területeit, amelyek mindkét oldalon tartalmaznak végződéseket. Az oliva inferior elenyésző számban tartalmazott rostokat és végződéseket (8C. ábra).



9. ábra. Anterográdjelölődött rostok és terminálisok az oculomotorius magban (A), a nucleus ruber parvocellularis és magnocellularis részében (B), a nucleus spinalis nervi trigemini a nervus mandibularis projekciós területén (C), az ipsilateralis abducens magban (D), a contralateralis NVD-ben (E) és a gerincvelő szintjében (F). Lépték: A, E: 20µm, B, C, D, F: 50µm

A leszálló rostokat a **gerincvelő** thoracalis szakaszáig tudtuk követni. A fehérállományában a rostok legnagyobb része az elülső kötegben halad az azonos oldalon, de jelölődtek rostok az oldalsó és hátsó kötegekben is. A canalis centralistól dorsalisán kereszteződő rostokat is találtunk. A végződésük legnagyobb része az azonos oldali szürkeállomány V, VII, VIII, és IX. Rexed laminában található, de néhány terminalis látható az azonos oldali III. és IV. laminában is. A nyaki szakaszon elhelyezkedő nucleus cervicalis centralis (CcN) a legtöbb végződést ipsilateralisan fogadta, azonban ez a mag kapott rostokat az ellenoldalon is (8D. és 9F. ábra).

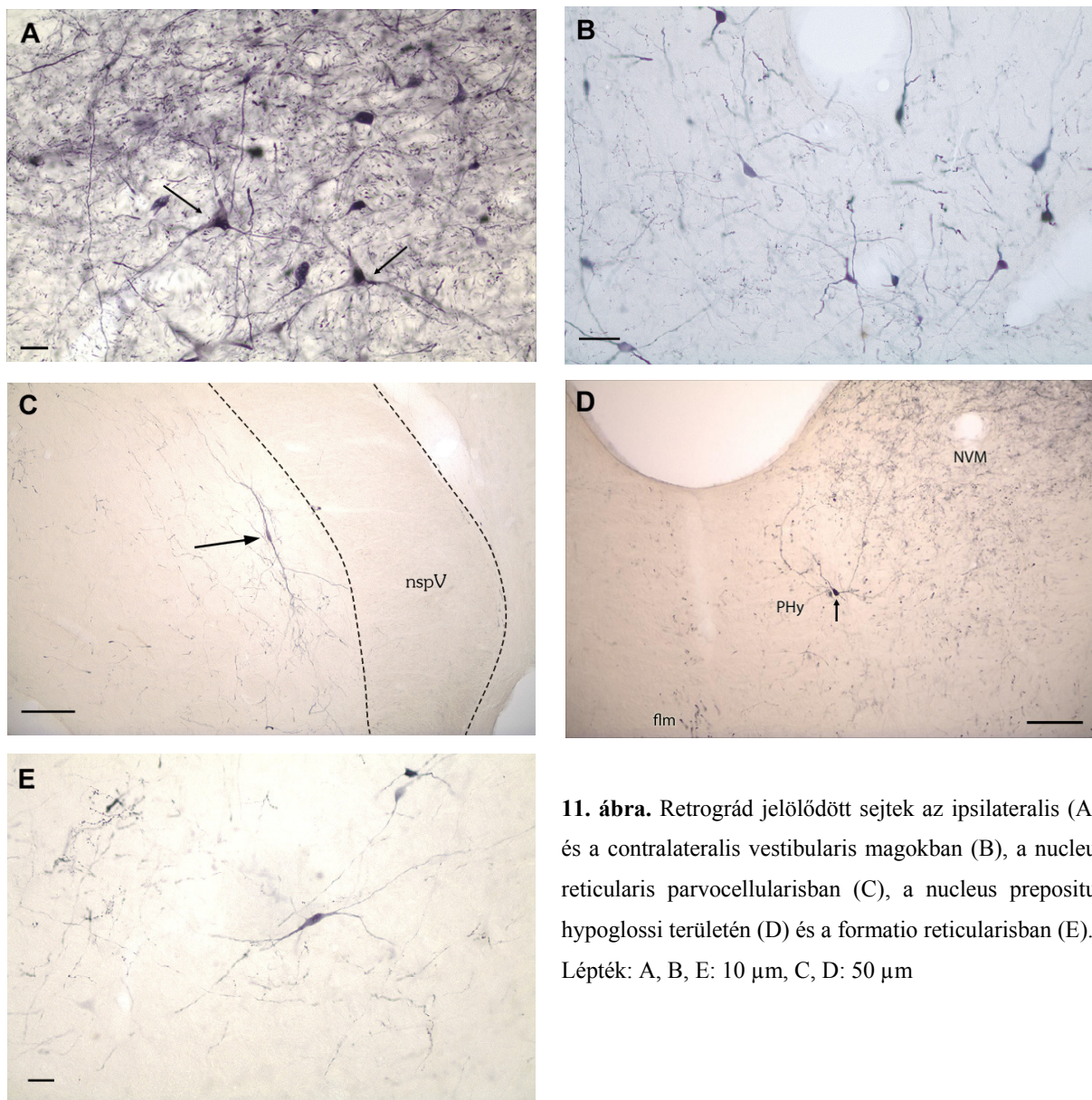
6.1.2. Retrográd projekció



10. ábra. Vázlatos rajz a rhombencephalon rostralis (A-B) és caudalis (C-D) részében retrográd jelölődött sejtek pozíciójáról.

Nem találtunk sejteket a diencephalonban és a mesencephalonban, a legrostrálisabb sejtek a **rhombencephalon**-ban jelölődtek. A rhombencephalon **rostrális részében** mindkét oldali vestibularis magokban (11A. és 11B. ábra), a formatio reticularis parvocellularis (11C. ábra), gigantocellularis és intermedier részében, a nucleus prepositus hypoglossiban (11D. ábra) és a nspV-ben találtunk retrográd jelölődött sejteket (10A-B. ábra).

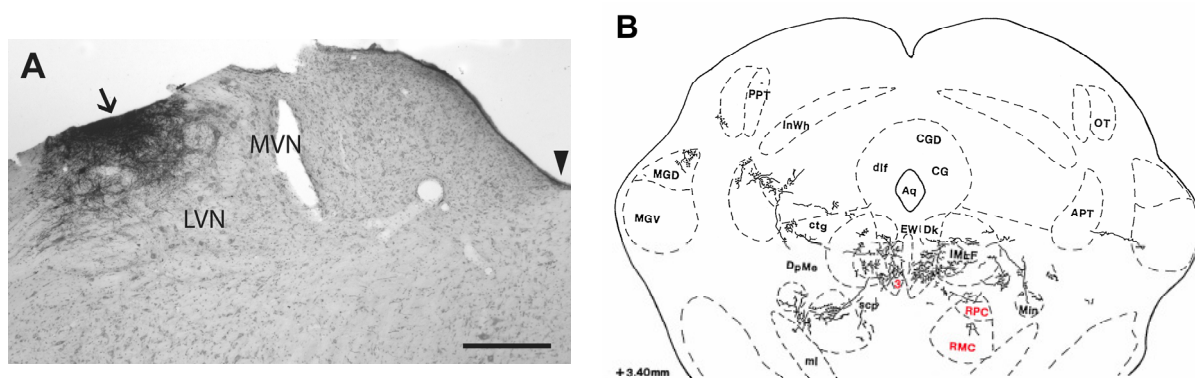
A **rhombencephalon caudalis részében** retrográd jelölődött sejtek láthatóak a hátsókötegi magokban, a nucleus gracilisben és cuneatusban, a nspV-ben, a nucleus tractus solitariiban, a nucleus prepositus hypoglossiban és a formatio reticularis intermedier, parvocellularis és gigantocellularis részében (11E. ábra). A rhombencephalon területén lévő neuronokra jellemző, hogy alakjuk kerek, vagy ovális, nagyságuk pedig 15-20 μm (10C-D. ábra).



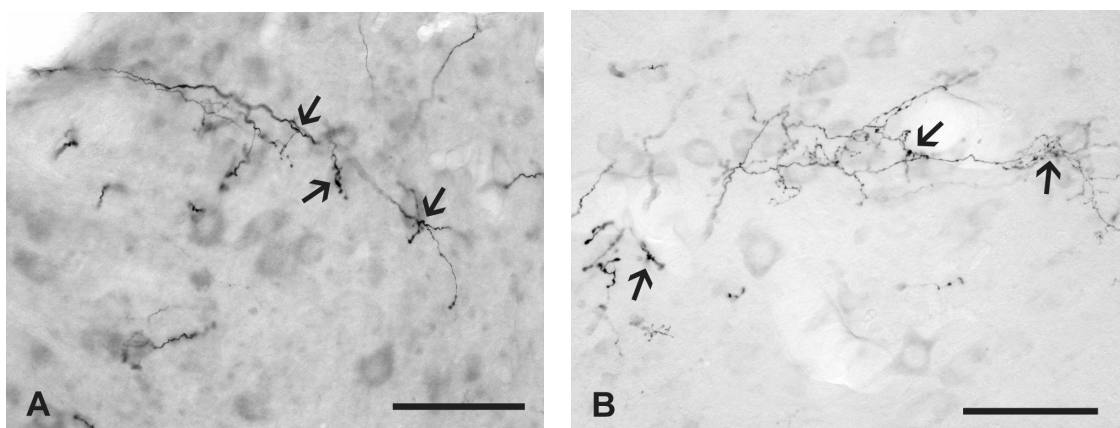
11. ábra. Retrográd jelölődött sejtek az ipsilateralis (A), és a contralateralis vestibularis magokban (B), a nucleus reticularis parvocellularisban (C), a nucleus prepositus hypoglossi területén (D) és a formatio reticularisban (E).
Lépték: A, B, E: 10 μm , C, D: 50 μm

6.2. A nucleus vestibularis superior (NVS) kapcsolata a nucleus motorius n. oculomotorii-val és a nucleus ruberrel

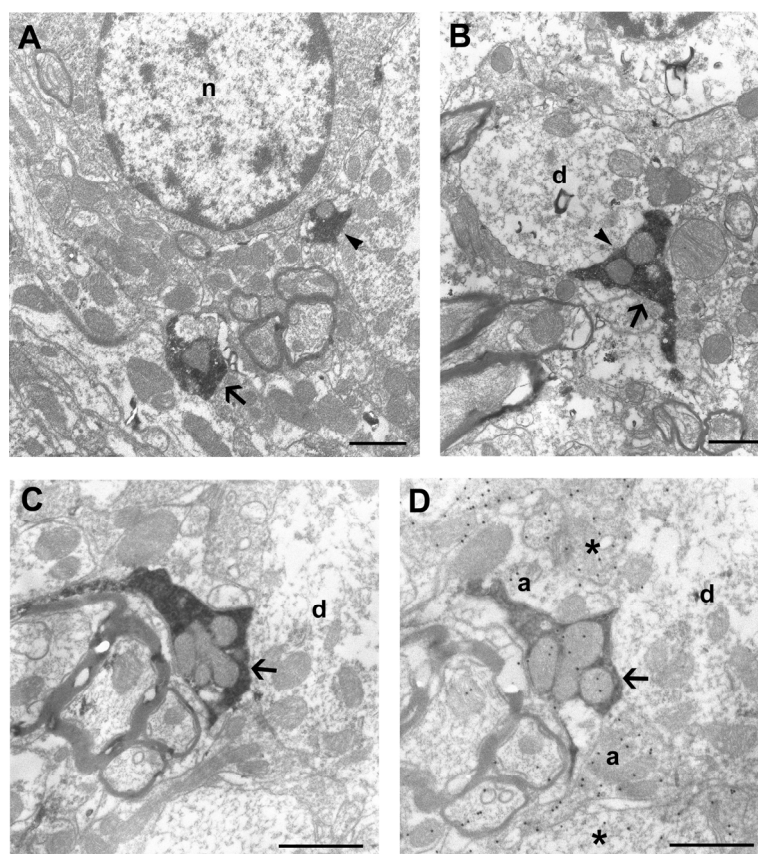
A NVS-ba történt PHA-L injekciót követően a jelölt rostok és terminalisok az idegrendszer különböző területein figyelhetők meg, többek között az oculomotorius magban és a nucleus ruber magnocelluláris részein (12A-B. ábra). Fénymikroszkópban a PHA-L pozitív rostok axon terminálisaikkal együtt egyenletes eloszlásban találhatók ezekben a magokban. A PHA-L-al jelölt boutonok többsége hasonló eloszlást mutatott az oculomotorius magban és a nucleus ruberben, ahol elsősorban a sejttestekkel és a proximális dendritekkel voltak szoros kapcsolatban (13. ábra). Ultrastrukturális szinten jól látható, hogy a PHA-L jelölt boutonok szinte kizárólag preszinaptikusan helyezkedtek el mind a két magban (14. ábra). A boutonok szimmetrikus szinapszisokat alakítottak ki, a posztszinaptikus képletek sejttestek vagy 3,5-4 μm átmérőjű dendritek voltak. Egyes esetekben a PHA-L jelölt boutonok olyan, nem jelölt axonterminálisokkal alakítottak ki kapcsolatokat, amelyek kerek és/vagy dense core vezikulákat tartalmaztak. Az oculomotorius magban 166 PHA-L-al jelölt boutont számoltunk meg, melyek közül 133 axodendritikus, 29 axosomatikus, 4 pedig axoaxonikus kapcsolatot alkotott. A nucleus ruberben ezen kapcsolatok száma 47, 16 és 2 volt (1. grafikon). A GABA immunhisztokémiai reakció alkalmazásával a NVS-ből eredő PHA-L-al jelölt terminálisok többsége immunogold részecskéket tartalmazott mind a nucleus oculomotorius-ban, mind a nucleus ruberben (14D. ábra), míg a posztszinaptikus képletek GABA negatívak voltak. A GABA immunreakció esetenként pozitív volt a PHA-L negatív boutonokban is. GABA pozitivitást figyeltünk meg olyan dendritekben és sejttestekben is, melyek nem képeztek szinaptikus kapcsolatot a PHA-L jelölt terminálisokkal (14D. ábra).



12. ábra (A) Mikroszkópos felvétel a PHA-L injekció helyéről a nucleus vestibularis superiorban (nyíl). Nyílhegy: középvonal. Lépték: 200 μm . (B) A mesencephalon szintje Paxinos és Watson (1998) által készített atlasz alapján.

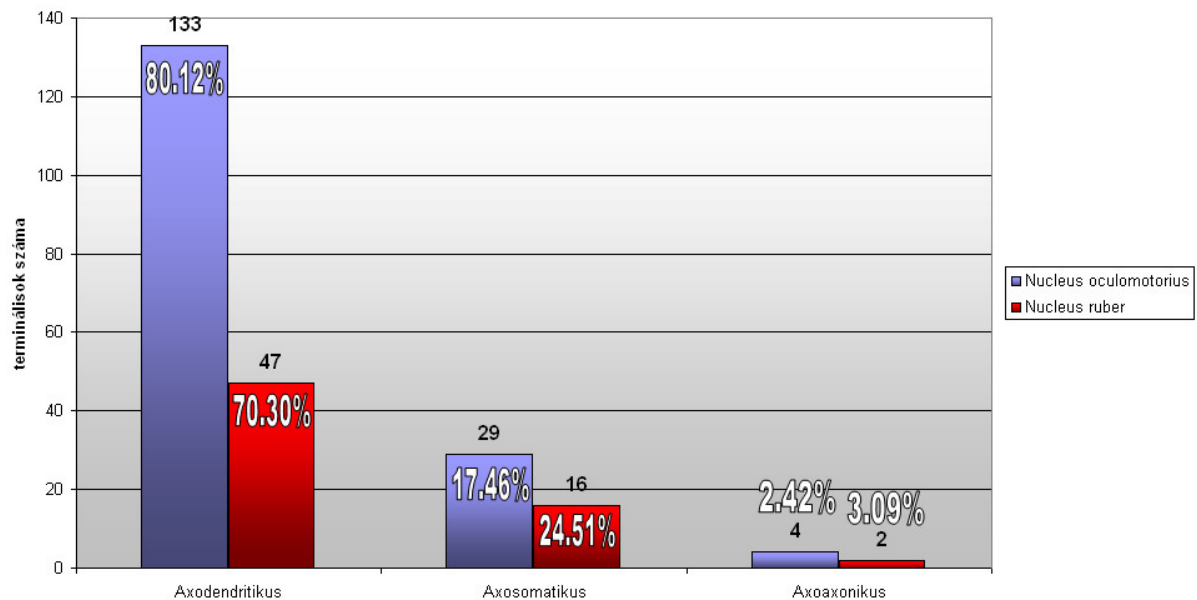


13. ábra. Fénymikroszkópos felvétel a nucleus vestibularis superiorból eredő PHA-L jelölt axonokról (nyilak) és a boutonokról a nucleus oculomotoriusban (A) és a nucleus ruberben (B). Lépték: 100 μ m



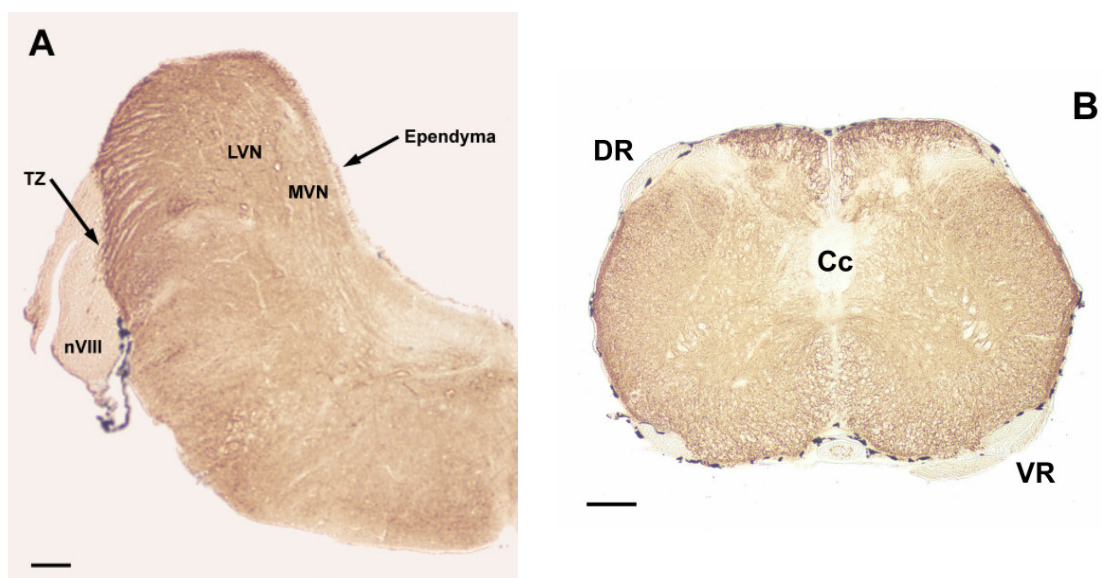
14. ábra. Elektronmikroszkópos felvételek a PHA-L jelölt terminálisokról az oculomotorius magban (A) és a nucleus ruberben (B-D). Axosomatikus (nyílhegy) és axodendritikus (nyilak) terminálisok. (B) A PHA-L jelölt terminálisok (nyíl) szimmetrikus axodendritikus kapcsolatot alakítottak ki (nyílhegy). d: dendrit. (C és D) A PHA-L-nel történő jelölés kombinálása postembedding GABA-immunhisztokémiai jelöléssel. (D) A GABA pozitivitást az arany szemcsék jelölik. Arany szemcséket láthatunk a PHA-L negatív axonokban (a) és dendritekben is (csillag). Lépték: 1 μ m

A PHA-L jelölt terminálisok eloszlása a nucleus oculomotoriusban és a nucleus ruberben



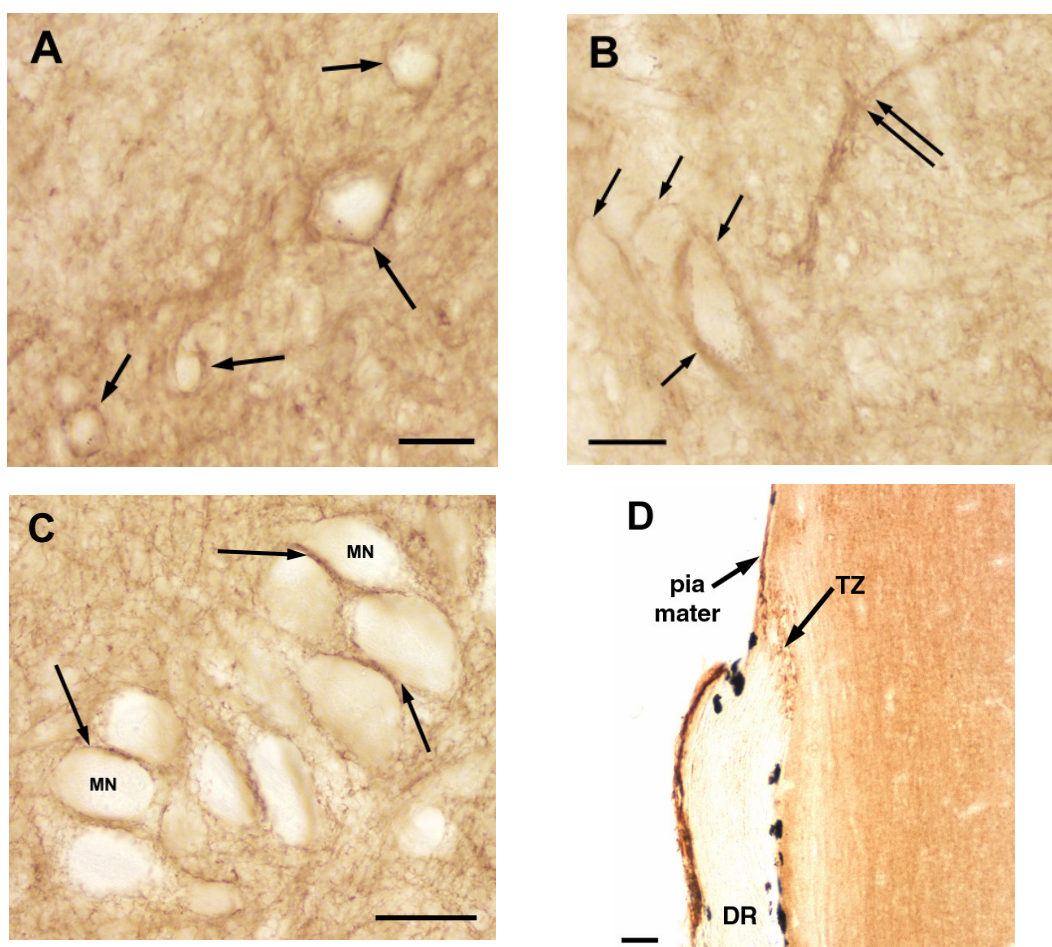
1. grafikon. A nucleus vestibularis superiorból eredő PHA-L jelölt terminálisok eloszlása az oculomotorius magban és a nucleus ruberben.

6.3. Az ECM molekulák normál eloszlása a béka idegrendszerében



15. ábra. (A) A hyaluronsav eloszlása az agytörzsben. (B) A hyaluronsav eloszlása a gerincvelőben. Lépték: 100µm

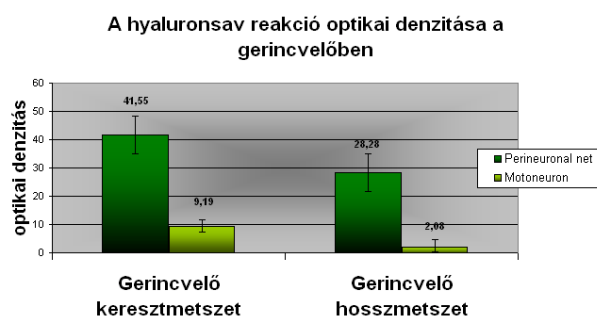
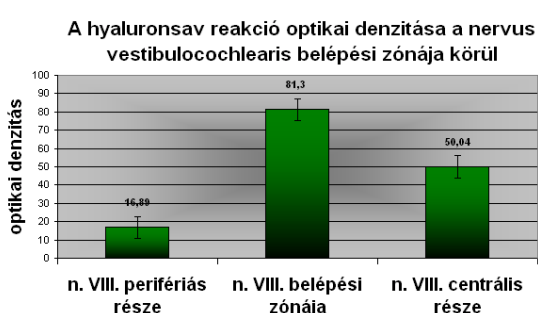
A negatív kontroll kísérletekben, ahol enzimatiszus emésztést alkalmaztunk a bHABC próba előtt, illetve ahol ez utóbbi próbát nem végeztük el, semmilyen jelölést nem észleltünk. A többi ECM makromolekula kimutatására alkalmas primer antitestek mellőzése esetén sem találtunk jelölést a metszetekben. A béka sternum porcszövetben, mely a bHABC reakció pozitív kontrolljaként szolgált, a porc alapállománya intenzív reakciót mutatott. A béka vesében a tubulusok és az erek lamina basalis erős immunreakciót mutatott tenascin C, laminin és fibronectin esetében. A béka és patkány kisagy Purkinje sejtjeiben a phosphacan immunreakció erősen pozitív volt.



16. ábra. (A) HA pozitív PN (nyíl) a NVL-ban. (B) FR neuron sejtestje és proximális dendritje (kettősnyíl) körüli HA pozitív PN. (C) HA pozitív PN a gerincvelői mooneuronok körül. (D) HA eloszlás a gerincvelői hátsó gyökérben és belépési zónájában. Lépték: A-C: 20 μ m, D: 50 μ m

A **hyaluronsav** reakció negatív volt a gerincvelői idegek és az agyidegek gyökerében, viszont kifejezetten erősen mutatkozott a belépési zónában (15A, 16D. ábra), majd az idegrostok

központi idegrendszerbe történő belépése után a reakció erőssége csökkent. Erősen HA pozitív TZ figyelhető meg a nervus vestibulocochlearis esetében is. (2. grafikon). A **fehérállomány** pozitív HA reakciót mutatott az egész neuraxisban, a legerősebb reakció a gerincvelő (15B. ábra) és az agytörzs területén figyelhető meg, és elsősorban az axonok körüli területek voltak pozitívak. A rhombencephalon fehérállományában a HA reakció intenzívnek mondható, legerősebb a tractus spinalis nervi trigemini, a tractus vestibulocochlearis és a gerincvelőből felszálló pályák mentén volt. A tractus solitarii és a subependymalis fehérállomány gyengén jelölődött. A **szürkeállományban** a HA pozitivitás granuláris formában jelent meg. Intenzív reakciót figyeltünk meg egyes idegsejtek perikaryonja és nagyobb dendritjeik kezdeti szakaszai körül, amely arra utal, hogy a HA a perineuronal net-ben is megtalálható (16A-B. ábra). Nagy nagyítással látható, hogy a HA pozitív PN körbefog egy HA negatív területet, ami a sejtestnek felel meg. A PN jól elkülöníthető a neuropiltól, mivel a HA reakció intenzitása lényegesen nagyobb a PN-ben (3. grafikon). Az agytörzs területén a szürkeállományban elsősorban a somatomotoros agyidegek magjaiban, valamint a cochlearis és a vestibularis magokban találtunk erős HA pozitivitást. A gerincvelői szürkeállományban a kevésbé festődött területek közé tartozik a hátsószarv felszínéhez közeli része, és a canalis centralis körüli terület. A mellső szarvban elsősorban a motoneuronok perikaryonja és nagyobb dendritjei körüli területek voltak erősen HA pozitívak (16C. ábra).

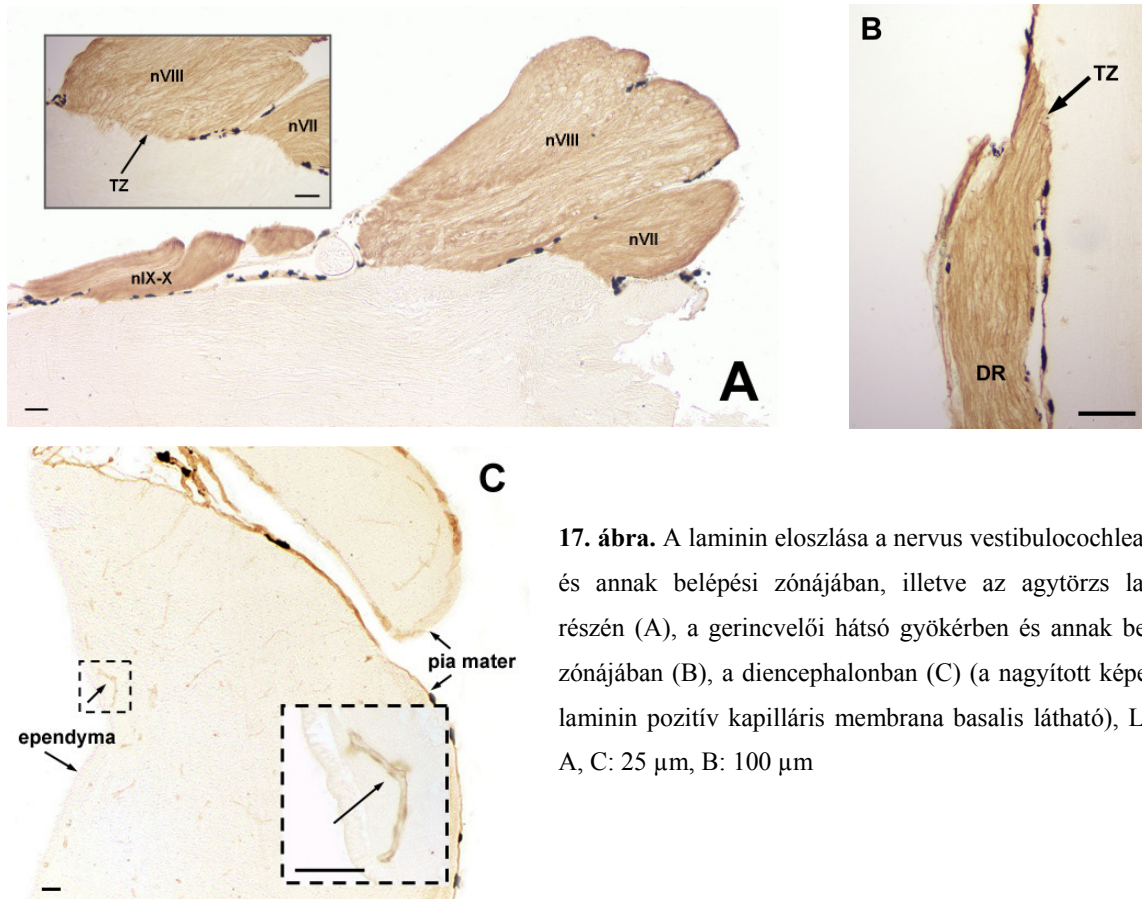


2. grafikon. A hyaluronsav reakció optikai denzitása a nervus vestibulocochlearis belépési zónájában (TZ).

3. grafikon. A hyaluronsav reakció optikai denzitása a gerincvelői motoneuronok körül.

A **laminin** IR nagyon erős volt a perifériás idegek gyökerében és belépési zónájában. Nagyobb nagyítással látható, hogy az idegrostokat körülvevő területen a laminin IR intenzitása nagyon erős, míg a rostoknak megfelelően a reakció negatív (17A-B. ábra). A belépési zóna területén a TZ-re jellemző szerkezetnek megfelelően a laminin pozitív terület kisebb kötegekben

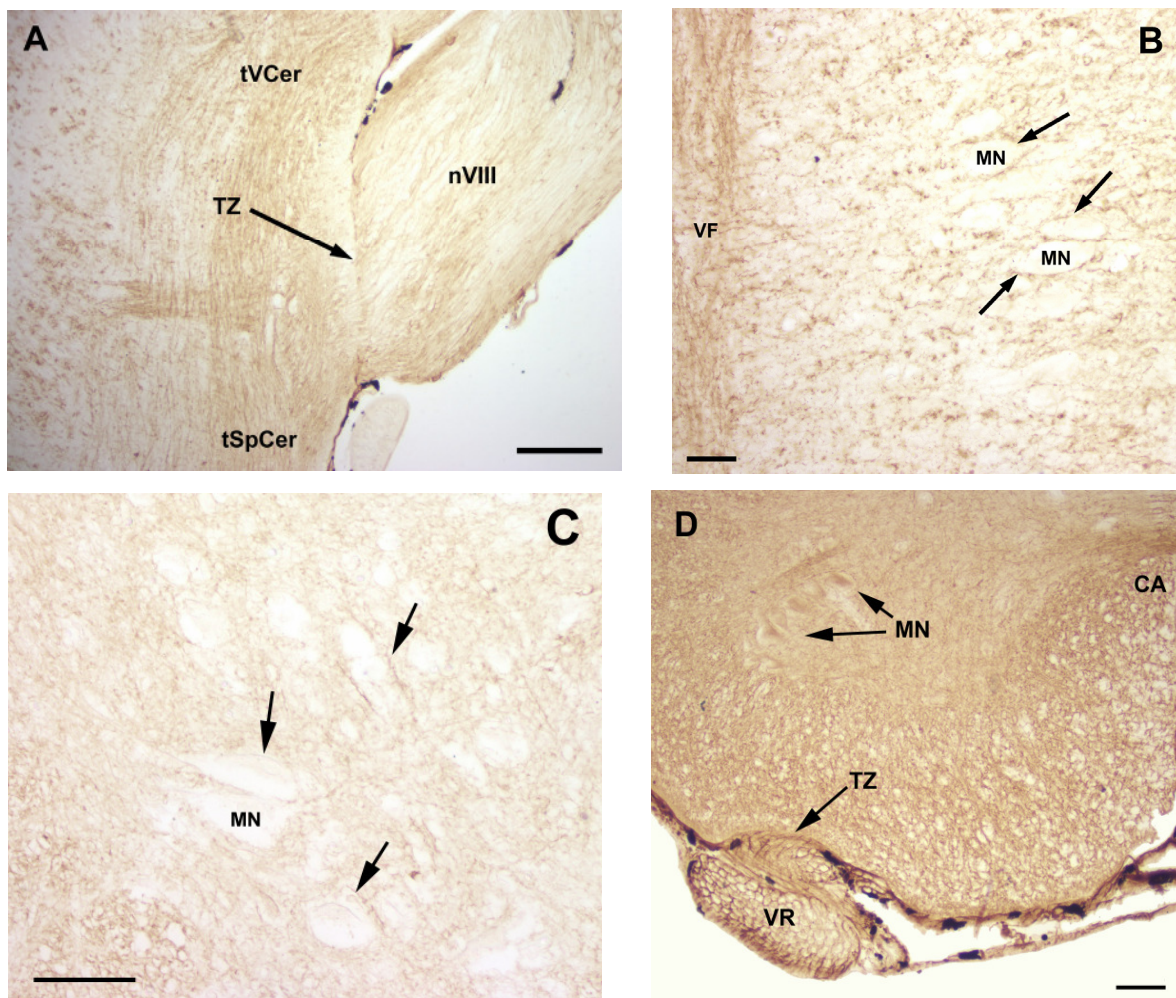
benyúlik a központi idegrendszer területére. A központi idegrendszerben azonban, beleértve a látóideget is, az agyburkok és az erek lamina basalis kivételével laminint nem tudtunk kimutatni (17C. ábra).



17. ábra. A laminin eloszlása a nervus vestibulocochlearisban és annak belépési zónájában, illetve az agytörzs laterális részén (A), a gerincvelői hátsó gyökérben és annak belépési zónájában (B), a diencephalonban (C) (a nagyított képen egy laminin pozitív kapilláris membrana basalis látható), Lépték: A, C: 25 μ m, B: 100 μ m

A **tenascin C** immunreakció eloszlása hasonló képet mutatott a HA reakcióhoz. Az agyidegek és a gerincvelői gyökök perifériás részén gyenge tenascin-C IR figyelhető meg az idegrostok közötti területen. A belépési zónában az intenzitás erőssége jelentősen megemelkedik, és a belépést követően az IR intenzitása a rostok körül nem csökken. A HA reakciótól eltérően a fehérállomány különböző területei között nem találtunk intenzitásbeli eltérést. Az agytörzsi szürkeállomány neuropilje gyengén festődik, emiatt jól elkülönül az egyes neuronok sejtestje és nagyobb dendritjei körül, elsősorban a vestibularis magkomplexben látható erősen pozitív PN-től. A PN által körülvett, sejtesteknek megfelelő terület negatív immunreakciót adott. A gerincvelői fehérállomány tenascin-C IR-ja erősnek mondható, nagyobb nagyítással a fehérállományban a tenascin-C heterogén eloszlását figyelhetjük meg. A ventrális commissuralis rostok erősen tenascin-C pozitívak voltak, és a gerincvelő szürkeállományába radier irányba sugároznak. A

gerincvelői szürkeállomány neuropilje negatív, így egy tenascin-C pozitív hálózat látható a sejtek körül, feltételezhetően a PN részeként (18A. és 18B. ábra).



18. ábra. A tenascin-C eloszlása a nervus vestibulocochlearisban, annak belépési zónájában, illetve az agytörzs laterális részén (A) és a gerincvelői fehérállományban, illetve a motoneuronok körüli PN-ben (B). Phosphacan pozitív PN a gerincvelői motoneuronok körül (C). A fibronectin pozitív belépési zóna, motoneuronok cytoplasmaja és commissura anterior. Lépték: A, D: 50 μ m, B, C: 20 μ m

A **phosphacan** IR enyhén pozitív volt a gerincvelői idegek és az agyidegek gyökerében, azonban jóval erősebbnek mutatkozott ezek belépési zónájában. Az agytörzsben a VIII. agyideg belépését követően a vestibuláris rostokat egészen a vestibuláris magok területéig erős phosphacan pozitív állomány veszi körül. A szürkeállományban a neuropil hasonló intenzitást mutat, mint a fehérállományban, azonban a vestibuláris magok idegsejtjei körül egy erősebb phosphacan IR pozitív terület figyelhető meg. A sejtesteknek megfelelő terület itt is negatív volt. A gerincvelőben a phosphacan elsősorban a fehérállományban mutatható ki. Az elülső illetve a

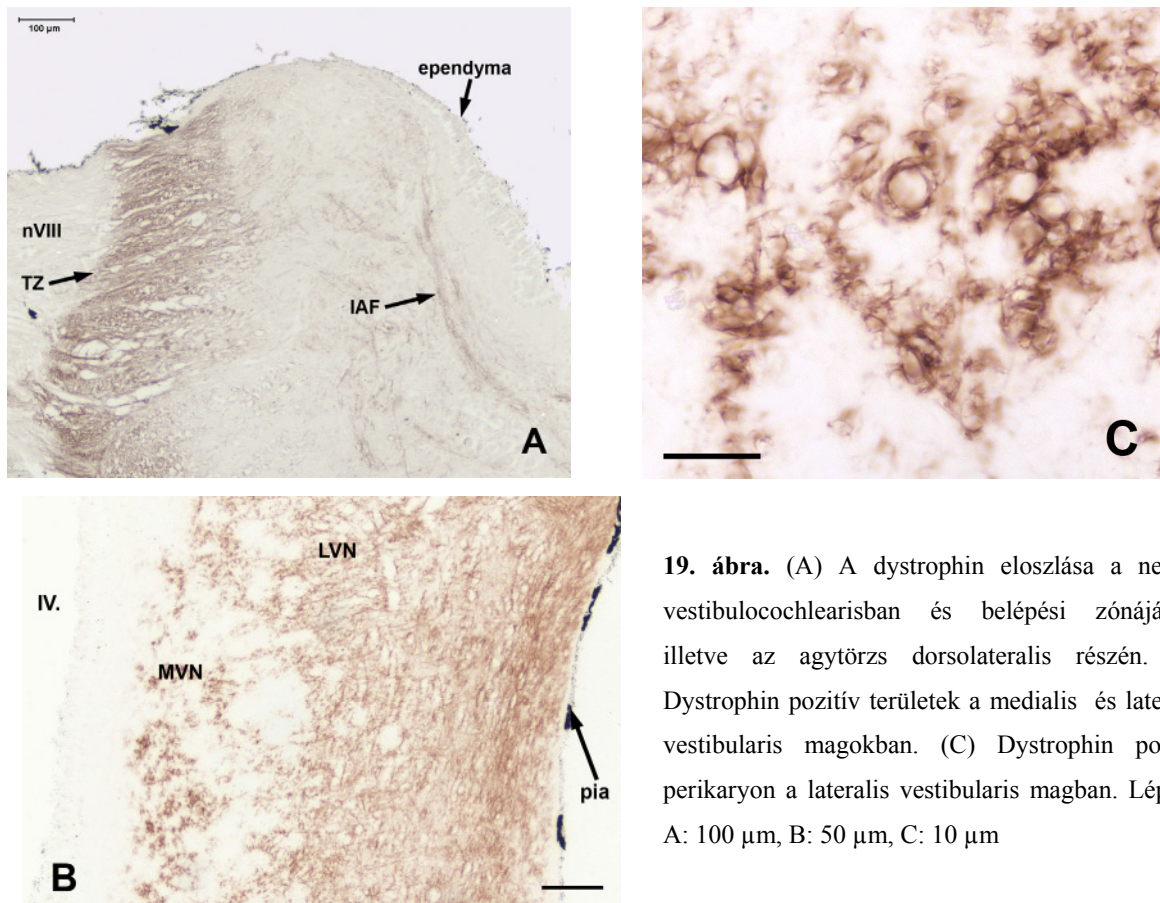
hátsó kötegben a reakció intenzitása erősebb, míg az oldalsó kötegben gyengébb volt. A phosphacan IR intenzitása a fehérállományban a felszín felől valamelyest csökken. Érdekes megjegyezni, hogy a rostok által kihagyott területen egy naptári napképhez hasonló formát láthatunk, egy phosphacan pozitív csomó látható az IR hiány közepén. A gerincvelői szürkeállomány valamivel gyengébben festenyzett mint a fehérállomány, azonban az egyes idegsejtek, különösen a motoneuronok körül phosphacan pozitív PN található. A PN jól elkülönül a szürkeállomány többi területétől. A fehérállomány felől itt is erősebb IR pozitivitású kötegek lépnek be a szürkeállomány területére, elsősorban az elülső szarvban (18C. ábra).

A **fibronektin** IR erős volt a perifériás idegrendszerben és a belépési zónában, mind az agyidegek, mind a gerincvelői idegek esetében. A perifériás idegekben elsősorban az axonokat körülvevő terület volt erősen pozitív. A belépési zónában a fibronektin IR intenzitása csak kis mértékben emelkedik és az agytörzsi fehérállomány felszínhez közeli részén is megközelítőleg azonos a reakció intenzitása, mint a perifériás idegekben. Az agytörzsben a fehérállomány többi része közepesen pozitívnak mondható. Az agytörzsi szürkeállomány neuropilje meglehetősen gyenge IR-t mutat, azonban egyes idegsejtek sejtestje és nagyobb dendritjei körül fibronektin pozitív terület figyelhető meg. A gerincvelőben a fehér- és szürkeállomány jól elkülöníthető a fibronektin IR alapján. A fehérállomány a perifériás ideghez képest gyengébb, vagy megközelítőleg azonos erősségű reakciót mutat. Az IR intenzitása a fehérállományban inhomogén, az idegrostokat körülvevő területek közepes fibronektin IR-t mutatnak, míg a rostoknak megfelelő középső terület teljesen negatív. Az elülső commissuralis rostoknak megfelelő területen itt is erősebb IR-t láttunk. A gerincvelői szürkeállományban a neuropil területén a fibronektin IR gyenge, így a PN alig ismerhető fel (18D. ábra). Egyes közepes és nagyobb gerincvelői idegsejtek cytoplasmájában kimutatható a fibronektin, de ezeknek a fibronektin pozitív sejteknek az eloszlása nem mutat regionalitást.

6.4. A dystrophin-glycoprotein komplex elemeinek eloszlása a béka idegrendszerében

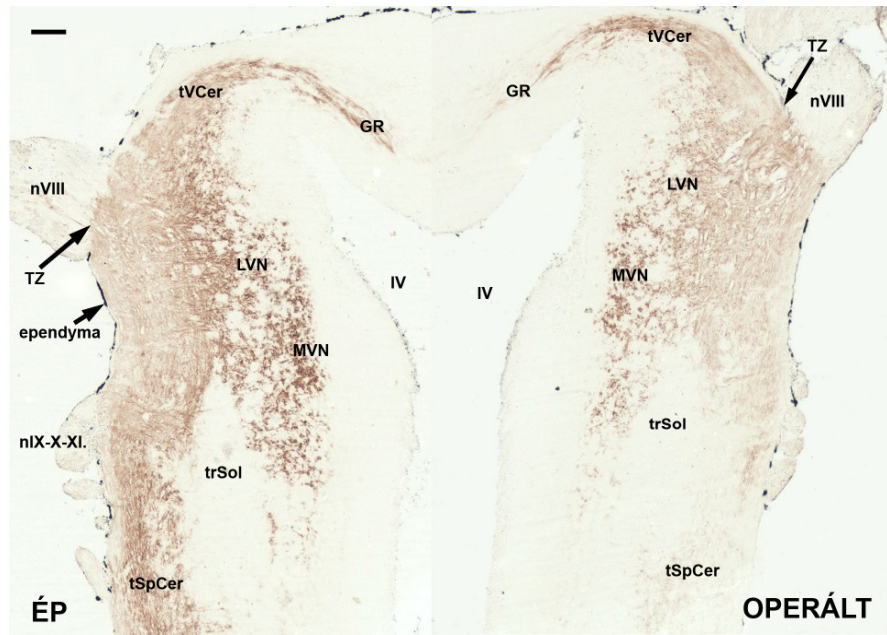
A **Dys2** IR a perifériás idegekben negatív volt, azonban a belépési zónában a reakció erősebbnek bizonyult. Az agytörzsi fehérállomány általában negatív, kivétel az agytörzs laterális része, ahol a vestibulocerebelláris és spinocerebelláris pályák is haladnak, és valószínűleg a vestibuláris magok idegsejtjeinek dendritjei is kinyúlnak erre a területre. A pozitivitás egészen a kisagyi szemcsesejtek területéig követhető, azonban a kisagyi sejtek negatívak (19. ábra). Előzetes vizsgálataink, amelyek nem képezik jelen PhD értekezés anyagát, azt mutatták, hogy a

vestibulocerebellaris pálya területén vestibuláris axotómiát követően csökken a dystrophin intenzitása, míg az ép oldalon minimális emelkedés mutatható ki (20. ábra). A NVL-ban a perikaryonok pozitívak, a NVM-ban viszont kevésbé erős a reakció. A gerincvelőben a Dys2 erősen pozitív a fehérállományban, különösen a hátsó kötegben, azonban az axonok negatívak voltak. A commissura anterior is jelölődött. A szürkeállomány területén a reakció negatív volt (21. ábra).

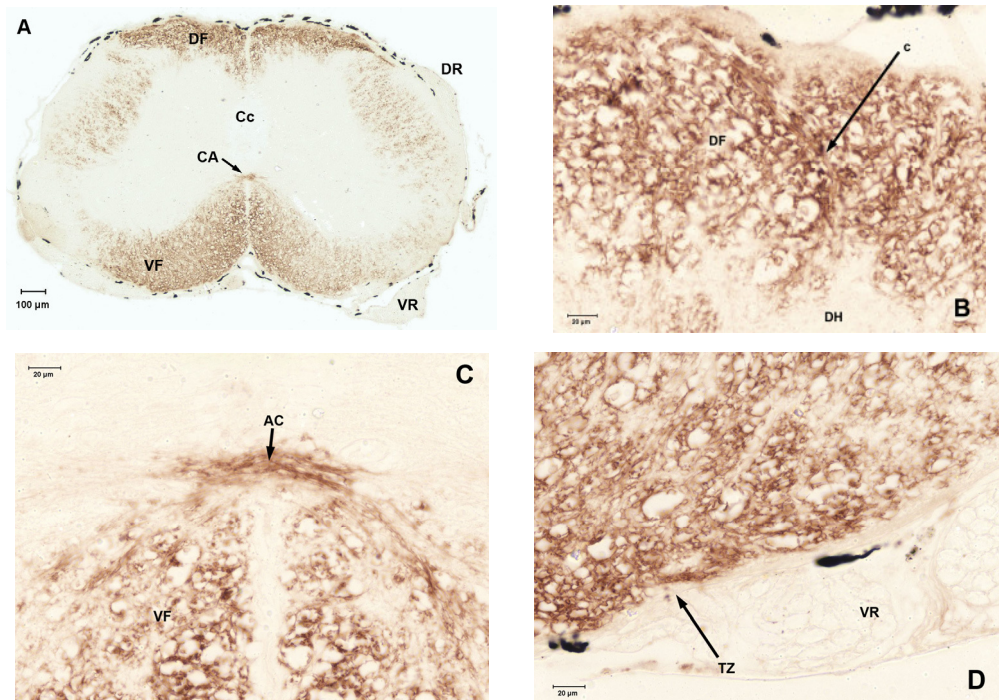


19. ábra. (A) A dystrophin eloszlása a nervus vestibulocochlearisban és belépési zónájában, illetve az agytörzs dorsolaterális részén. (B) Dystrophin pozitív területek a medialis és laterális vestibularis magokban. (C) Dystrophin pozitív perikaryon a laterális vestibularis magban. Lépték: A: 100 μ m, B: 50 μ m, C: 10 μ m

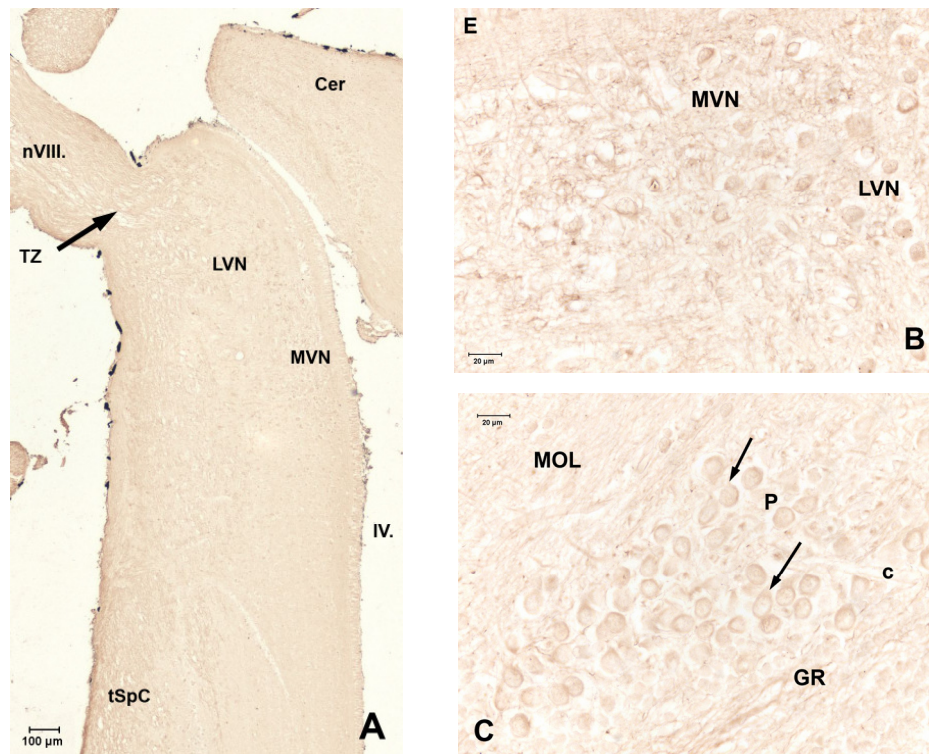
A **beta-dystroglycan** IR intenzitása erősebb volt a perifériás idegekben, összehasonlítva a központi idegrendszer fehérállományával. A NVM és NVL területén az idegsejtek perikaryonja és egyes sejtek dendritje is erősen pozitív. A kisagyi fehérállomány enyhén pozitív, hasonlóan a Purkinje sejtek is. Az erek és kapillárisok membrana basalis pozitív reakciót mutat (22. ábra). A gerincvelői fehérállományban és a perifériás idegben az axonok illetve körülöttük lévő terület pozitív volt a beta-dystroglycan kimutatására szolgáló IR-val. A szürkeállomány területén a motoneuronok és egyes hátsószarvi sejtek mutattak pozitivitást (23. ábra).



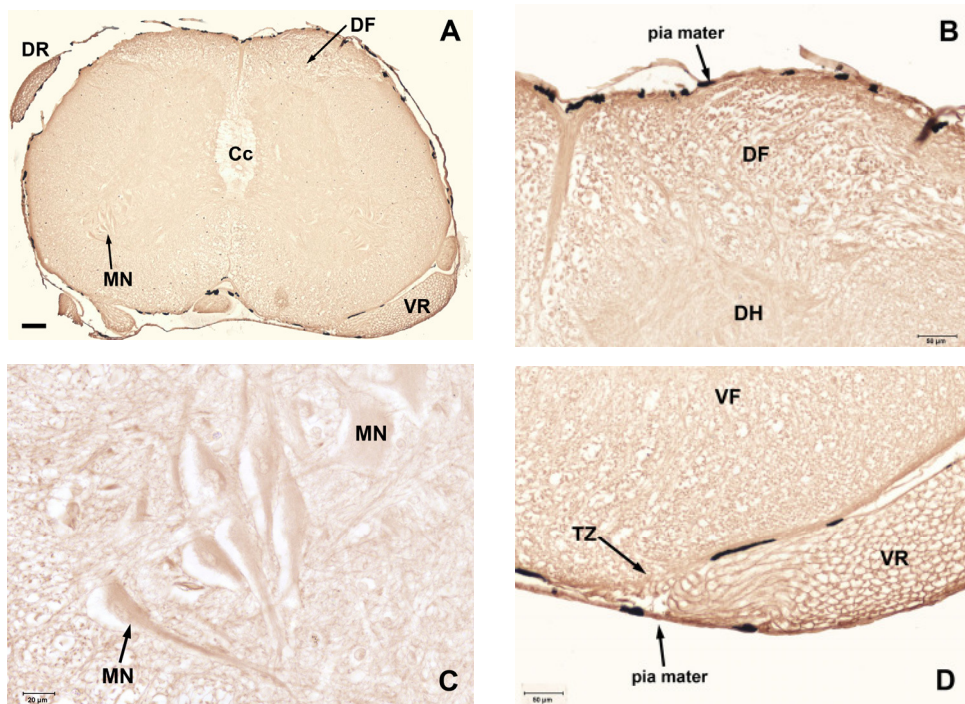
20. ábra. A dystrophin eloszlásában bekövetkező változás az ép és az operált oldalon a vestibularis axotómiát követő 5. postoperatív napon. Lépték: 100 μ m



21. ábra. (A) A dystrophin eloszlása a gerincvelőben. (B-D) Nagyobb nagyítású felvételek a hátsó köteg (B), a commissura anterior (C) és a mellső gyökér területén (D). Lépték: A: 100 μ m, B-D: 20 μ m

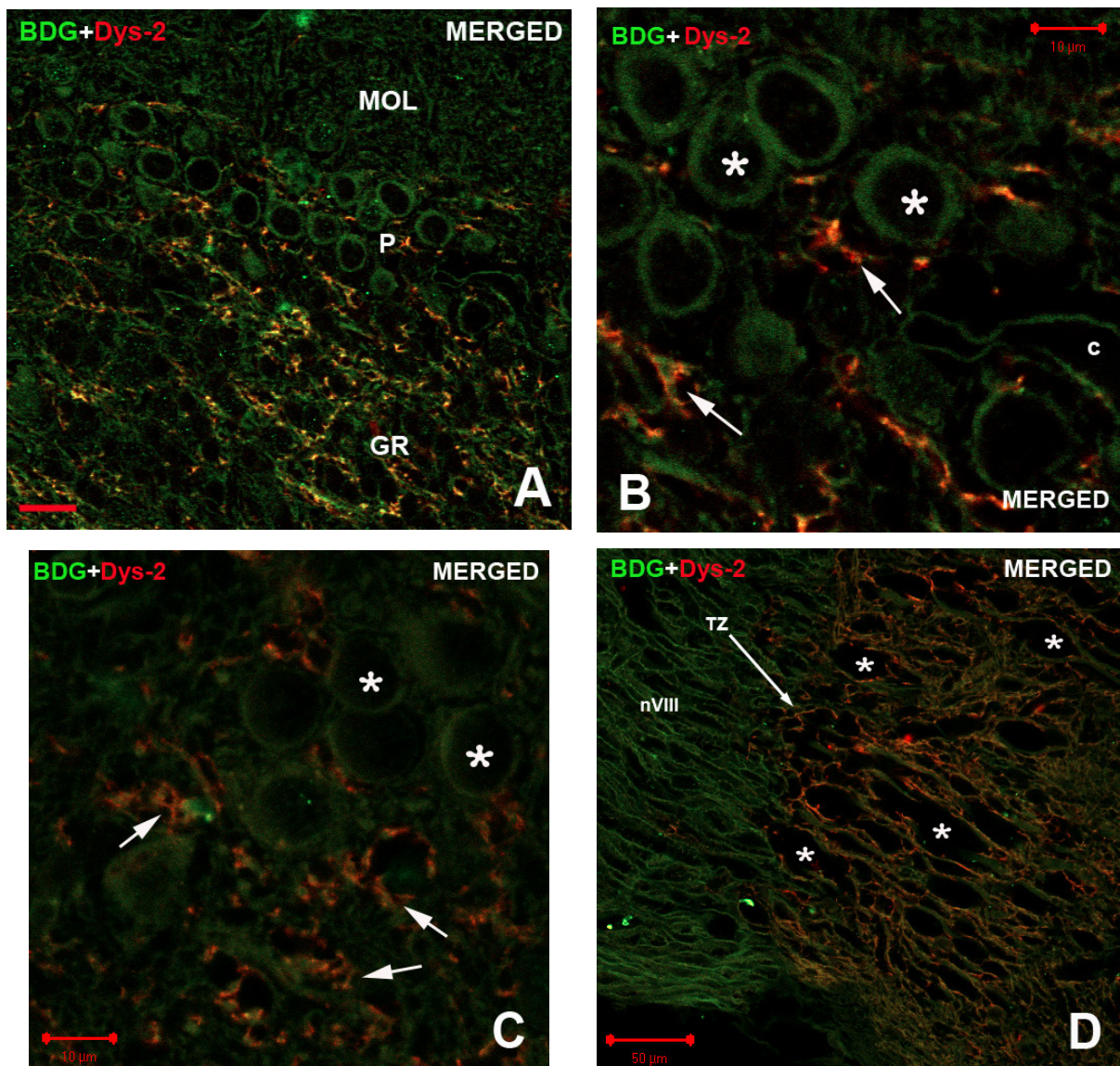


22. ábra. A beta-dystroglycan eloszlása az agytörzsben (A), a medialis és lateralis vestibularis magokban (B), illetve a kisagyban (C) Lépték: A: 100 µm, B, C: 20 µm



23. ábra. A beta-dystroglycan eloszlása a gerincvelőben (A). (B) Nagyobb nagyítással a hátsó szarv dorsalis részén és a hátsó köregben, (C) a gerincvelői motoneuronok cytoplasmájában, és (D) a gerincvelői elős gyökérben illetve annak belépési zónájában. Lépték: A: 100 µm, B, D: 50 µm, C: 20 µm

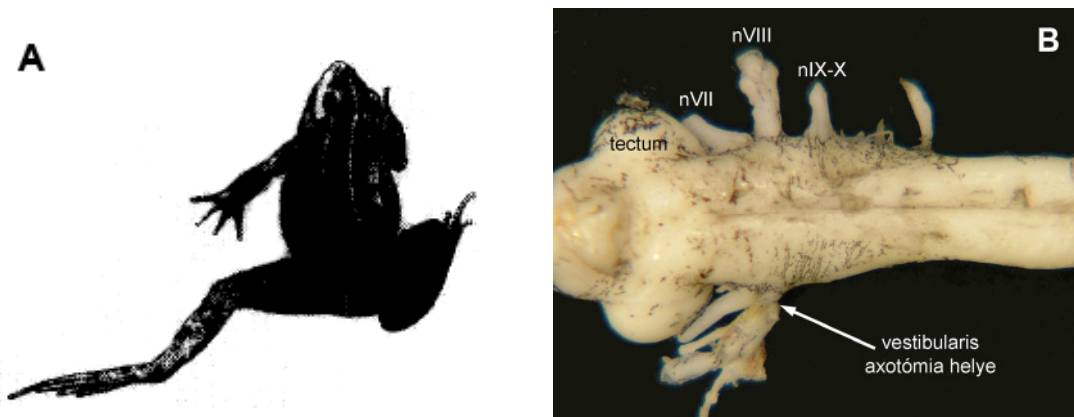
Kettős immunhisztokémiai jelöléssel jól látható, hogy a kisagy területén a Purkinje sejtek cytoplasmája BDG pozitív, míg a vestibulocerebellaris rostok, amelyek a szemcsesejteken végződnek, Dys2 pozitívak. A NVM területén a nagyobb idegsejtek perikaryonja pozitív mind BDG-ra, mind dystrophin-ra, azonban egyes sejtek cytoplasmája csak BDG pozitivitást mutat. Az idegsejtek közötti neuropil Dys2 pozitív. A nervus vestibulocochlearis perifériás részében az axonok körül csak BDG pozitív reakció figyelhető meg, míg a belépési zónában illetve a központi idegrendszerben található vestibularis rostok körül kettős jelölés látható (24. ábra).



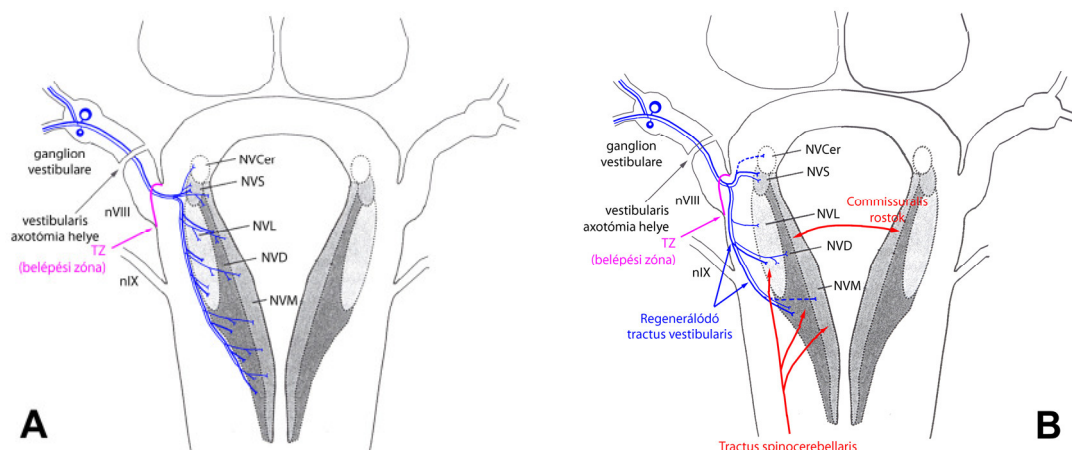
24. ábra (A-B) A BDG és dystrophin kolokalizációja a kisagyban. (C) A BDG és dystrophin eloszlása nucleus vestibularis medialisban. (D) BDG és dystrophin eloszlása a nervus vestibulocochlearisban és belépési zónájában. Lépték: A: 20 μ m, B, C: 10 μ m, D: 50 μ m

6.5. A nervus vestibulocochlearis regenerációjának vizsgálata

A vestibularis deafferentációt követően az állatok a vestibularis lézióra jellemző tüneteket mutattak, fejüket úgy tartották, hogy az operált oldalt a föld felé fordították, illetve a lézióra jellemző testhelyzetet vették fel (25A. ábra). A műtétet követő 6 héttől a lézióra jellemző tünetek fokozatosan megszűntek. A korai szakaszban az axotómia helyén a VIII. agyideg regenerálódott részét egy erősen vaszkularizált kötőszövetes struktúra borította. Ennek a szövetnek az eltávolításakor előben erős vérzés jelentkezett, amely megnehezítette a Neurobiotinnal történő jelölést. Később azonban óvatos preparálással a kötőszövetes heget könnyen el lehetett távolítani, és ilyenkor a regenerálódó terület a nervus vestibulocochlearison jól kivehető volt (25B. ábra).



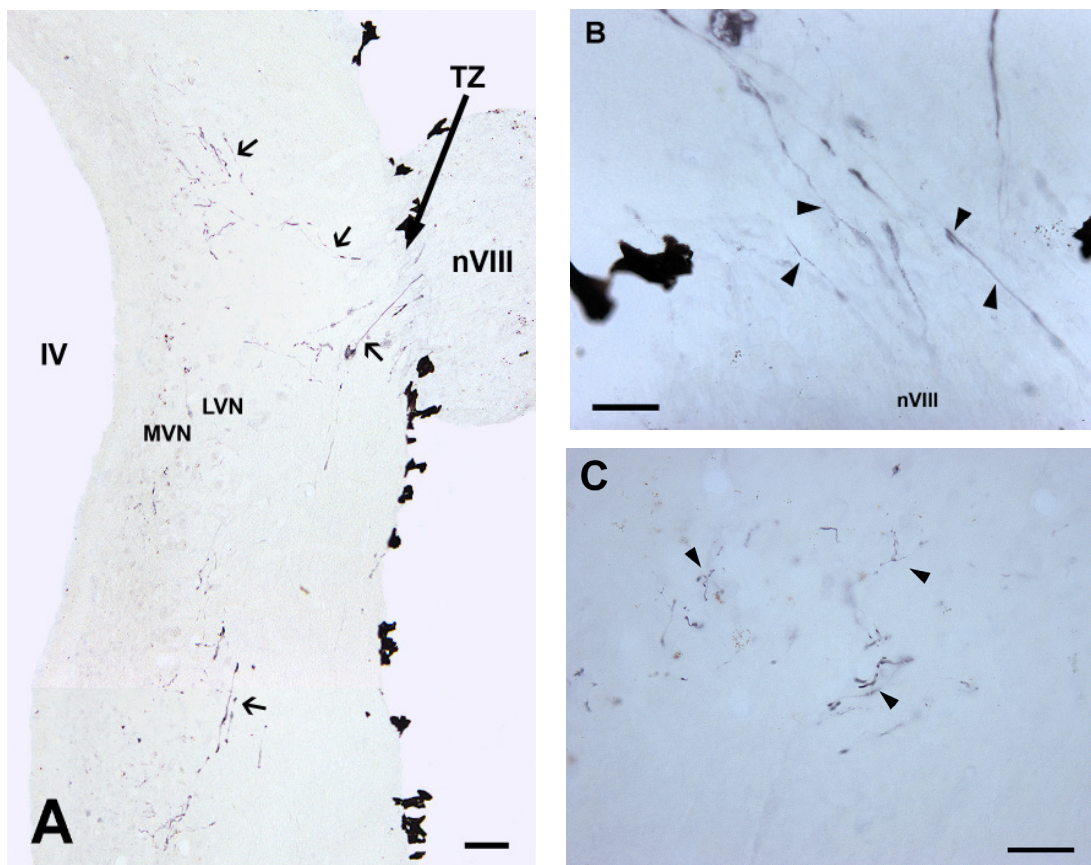
25. ábra. (A) A vestibularis léziót követően a békák által felvett testtartás. (B) Regenerálódott nervus vestibulocochlearis a 12. postoperatív héten, eltávolított agytörzs Sainte Marie fixálást követően.



26. ábra. Vázlatos rajz a vestibularis rostok elhelyezkedéséről vestibularis léziót megelőzően (A), illetve azt követően (B). A piros színnel jelölt rostok az axonal sprouting lehetséges forrásai.

6.5.1. A regenerálódó rostok neurobiotin jelölése

A korábbi axotómiától distalisan átvágott VIII. agyideg proximális végére helyezett neurobiotin megfelelő transzport idő után kimutatható volt a nervus vestibulocochlearisban és az agytörzsben is. A regenerálódott rostoknak eltérő átmérőik voltak, az 5. postoperatív hétig csak vastag rostok láthatóak, míg ezt követően már a vékony és vastag rostok keverten találhatók. A rostok lefutása rendezetlen és felcsavarodott volt. Az agytörzsbe történő belépéskor a rostok egy felszálló és egy leszálló köteget alkottak, a regenerálódott tractus vestibularis a normál állatokhoz képest laterálisan helyezkedett el. A tertier ágakon, melyek a normál állapothoz képest hosszabbak és csavartabbak voltak, gyöngyfüzér-szerű megvastagodásokat találtunk, amelyek feltehetően en passant boutonoknak felelnek meg. Rostrálisan a rostokat egészen a kisagyig tudtuk követni, caudalis irányban pedig a regenerálódott rostok elérték a tractus solitarius szintjét (26. és 27. ábra).



27. ábra. (A) Neurobiotin jelölt regenerálódott vestibularis rostok (nyilak) a 8. postoperatív héten. (B) Regenerálódott rostok a nervus vestibulocochlearis belépési zónájában (nyílhegyek). (C) Regenerálódott rostok és boutonok (C) a NVL-ban. Lépték: A: 50 μ m, B, C: 25 μ m

A vestibuláris magkomplex minden tagjában megtaláltuk a regenerálódott rostokat. A legtöbb rost a NVD-ban és az NVL-ban volt, míg az NVM-t és az NVS-t kevesebb tertier rost érte el, melyek az átlagosnál hosszabbnak tűntek. A rostok megoszlása és morfológiája a vestibularis magkomplexen belül hasonló volt a korábbi eredményekhez [5].

6.5.2. A hyaluronsav eloszlási mintázatának változása post-ganglionáris vestibularis axotomiát követően

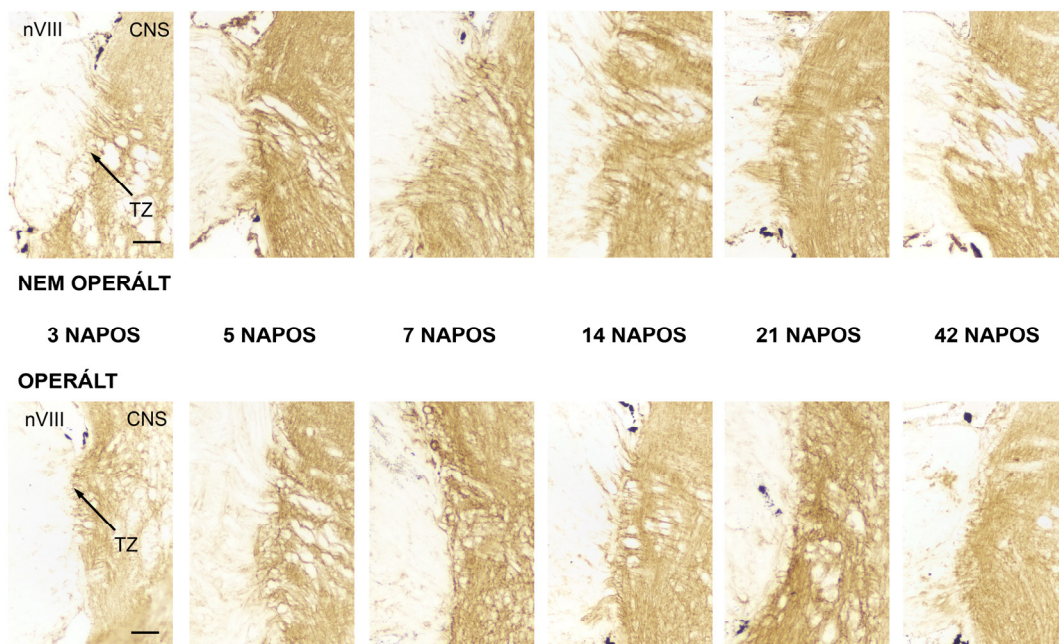
A negatív kontroll kísérletekben az ECM molekulák normál eloszlásánál leírt eredményeket kaptuk. Post-ganglionáris vestibularis axotomiát követően hyaluronsav eloszlási mintázatában az alábbi változásokat figyelhetjük meg.

A denzitások időbeli változását mutató ábrákon a kontrollhoz képest magasabb denzitást az egynél *kisebb* értékek jelentik. Ugyanakkor, hogy a nagyobb denzitáshoz *magasabb* oszlop tartozzon a vertikális denzitás tengelyt megfordítva ábrázoltuk (4-6.grafikon).

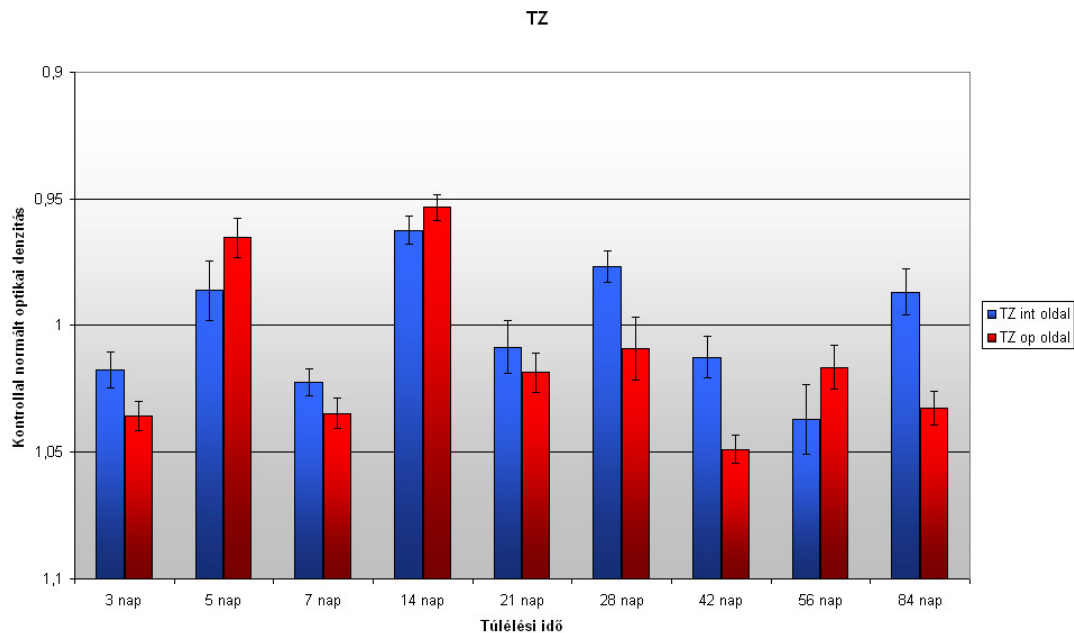
Az axotómiát követő harmadik naptól megemelkedett a HA reakció intenzitása a **VIII. agyideg perifériás részében**, az intenzitás maximuma a 42. postoperatív napon volt megfigyelhető.

Mikroszkópos vizsgálattal a **belépési zónákban** az operált oldalon az 5. postoperatív napra, míg az ép oldalon a 14. napra megemelkedett a HA reakció intenzitása. Az optikai denzitás mérésével a 3. postoperatív napon a HA próba intenzitása valamivel alacsonyabb volt, mint a kontroll állatokban mért érték, majd a HA reakció intenzitása szignifikánsan nőtt a 3. és 5. postoperatív nap között az operált oldalon ($p=0,042$, t-próba). Az ép oldalon az intenzitás emelkedés mértéke valamivel kisebb volt, mint az operált oldalon, de az 5. postoperatív napon a TZ intenzitása mindkét oldalon meghaladja a kontroll (nem operált) állatokban mért HA intenzitást. Az 5. és 7. nap között az operált oldalon megfigyelhető reakció intenzitás csökkenés nem szignifikáns ($p=0,087$, t-próba), és az ép oldalon a csökkenés mértéke valamivel kisebb. A 7-14. nap között a reakció intenzitása ismét emelkedik az operált és az ép oldalon, de az operált oldalon nagyobb mértékben az ép oldalhoz képest ($p=0,00003$, t-próba). A legmagasabb denzitást az ép és a kezelt oldalon is a 14. post-operatív napon észleltük, és az optikai denzitás mérésével a HA próba intenzitása a TZ-ban ekkor meghaladja a kontroll állatokban mért intenzitást. A 14-21. napok közötti intervallumban az operált oldalon a reakció intenzitása csökken ($p=0,003$, t-próba) és a reakció intenzitása megközelítőleg megegyezik a kontroll állatokban mért értékkel. A 21-28. nap között nincs szignifikáns változás ($p=0,669$, t-próba). Ezt követően a vizsgált 42., 56. és a 84.

napokon a kontroll állapothoz hasonló szinten stabilizálódott, illetve valamivel alatta alakult a reakció intenzitása a TZ-ban (21-84. nap, linearis regresszió, $p=0,348$) (28. ábra, 4. grafikon).



28. ábra. A hyaluronsav reakció változása a belépési zónában (TZ) vestibuláris léziót követően. Lépték: 50 μ m

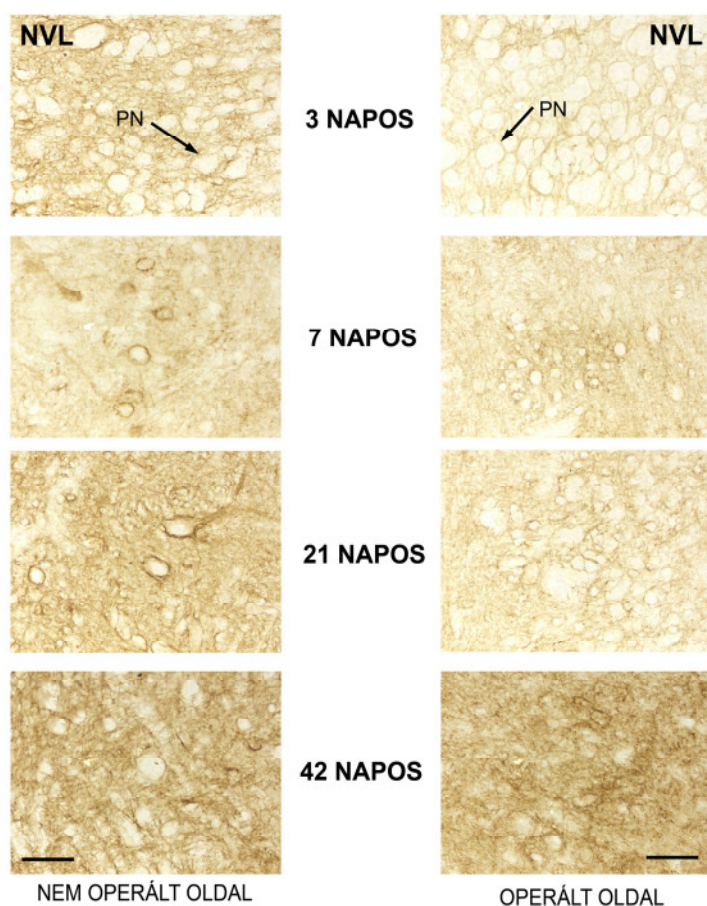


4. grafikon. A hyaluronsav reakció optikai denzitásának változása vestibularis léziót követően a belépési zónában.

A belépési zónában és a VIII. agyideg perifériás részében megfigyelhető változásokkal szemben a **nucleus vestibularis medialisban** található idegsejtek körüli **perineuronalis netben** a mikroszkópos felvételeken a HA próba intenzitása a 3. postoperatív napon a környező neuropiltól alig volt megkülönböztethető. Az intenzitás csökkenés kifejezettebb volt az operált oldalon, de változás figyelhető meg az ép, contralateralis oldalon is. Ezt mutatják az optikai denzitás mérési eredmények is (mivel a kontrollal normál optikai denzitás értékek > 1). A 3-5. postoperatív nap között erőteljesen nőtt az intenzitás az optikai denzitás mérései alapján ($p < 0,04$, t-próba) és a kontrollhoz hasonló értéket ért el, azonban ez a változás mikroszkópos vizsgálataink során nem volt szembetűnő. Az 5-7. nap között a reakció intenzitása csökkent ($p = 0,00004$, t-próba), és a 3. postoperatív napon mért értéknél lényegesen alacsonyabb szintet mutatott. Az operált oldalon a csökkenés nagyobb, mint az ép oldalon. A 7-14. nap között az HA reakció intenzitásában nem volt szignifikáns változás ($p = 0,355$, t-próba). A mikroszkópos felvételek elemzésekor a HA reakció intenzitás csökkenése a NVM PN-jében egészen a 14. postoperatív napig figyelhető meg és a legkisebb intenzitást a 7. és 14. postoperatív napokon mutatja. Ezután az ép oldalon egy gyors és intenzív növekedés látható a HA reakció erősségében egészen a műtétet követő 42. napig. Az operált oldalon a 21. napon a PN mikroszkópos vizsgálattal még nem volt megkülönböztethető a neuropiltól és az ép oldalhoz képest késve, csak ezt követően figyelhető meg HA próba intenzitásában emelkedés. Mikroszkópos vizsgálattal az operált oldalon is a 42. postoperatív napra jelenik meg a perineuronal net az NVM-ben. Ezt követően már csak kisebb mértékű reakció intenzitás-növekedés volt megfigyelhető, azonban a reakció ekkor már erősebb volt, mint kontroll állapotban. A mért optikai denzitások alapján a NVM-ban a 7. naptól a 42. napig a reakció intenzitása fokozatosan nő az operált oldalon ($p = 4,25 \cdot 10^{-13}$, lineáris regresszió). Az ép és az operált oldali NVM-ban a HA próba intenzitása a 42. postoperatív napra éri el a kontroll állatokban mért értéket (denzitás érték ~ 1). A 42. és 84. nap között nem találtunk szignifikáns változást a HA reakció intenzitásában ($p = 0,878$, lineáris regresszió) (5. grafikon).

A **nucleus vestibularis lateralis perineuronalis netjében** is hasonló változások következtek be, mint a medialis vestibularis mag esetében. A 3. postoperatív napra a HA próba intenzitása annyira lecsökkent, hogy a PN megkülönböztethetetlen volt a neuropiltól, melyet az optikai denzitás mérés is megerősít. Majd az 5. postoperatív napra a reakció intenzitása megemelkedett ($p < 0,01$, t-próba), ez a változás azonban mikroszkópos vizsgálattal nem volt szembetűnő. Az NVL-ban az 5-7. nap között jelentős csökkenés figyelhető meg a reakció intenzitásában ($p = 0,005$, t-próba), és a HA próba intenzitása a 7. napon megközelítőleg azonos, a

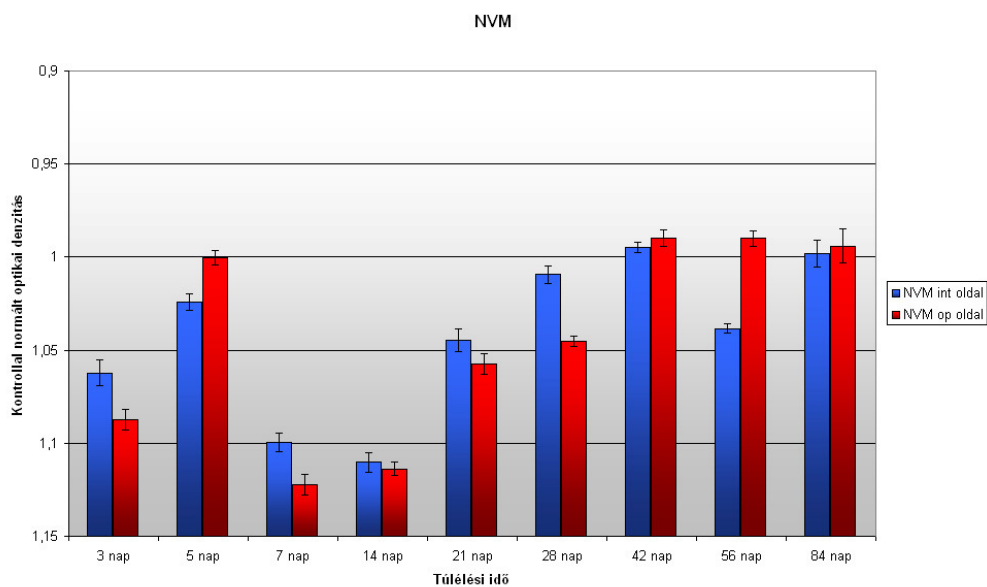
3. napon mért értékkel. A 7. és a 14. nap között az operált oldal intenzitásában nincs szignifikáns változás ($p=0,740$, t-próba). Mikroszkópos vizsgálattal a NVL-ban az ép oldalon a reakció intenzitás csökkenése a PN-ben egészen a 14. postoperatív napig volt követhető, majd ezután gyors és intenzív növekedés látható a HA próba intenzitásában 28. postoperatív napig, hasonlóan a NVM-ban megfigyeltékhez. Az operált oldalon a PN mikroszkópos vizsgálattal a 28. napig alig volt megkülönböztethető a neuropiltól és csak ezt követően kezdett a reakció intenzitása emelkedni. Mind a két oldalon kb. a 42. postoperatív napra jelenik meg a perineuronal net. Szemben a mikroszkópos vizsgálattal, a lineáris regresszió analízis alapján a 14-28. nap között a reakció intenzitás az operált oldalon szignifikánsan emelkedik ($p=0,00007$). Optikai densitásméréssel és az eredmények normálását követően jól látható, hogy a HA próba intenzitása a 21. és a 28. postoperatív nap között éri el a kontroll állatokban mért értéket, sőt kis mértékben meg is haladja azt, mind az operált, mind az operálatlan oldalon. Majd ezt követően a 28-84. nap között azonban már nincs szignifikáns változás ($p=0,32727$, lineáris regresszió) (29. ábra, 6. grafikon).



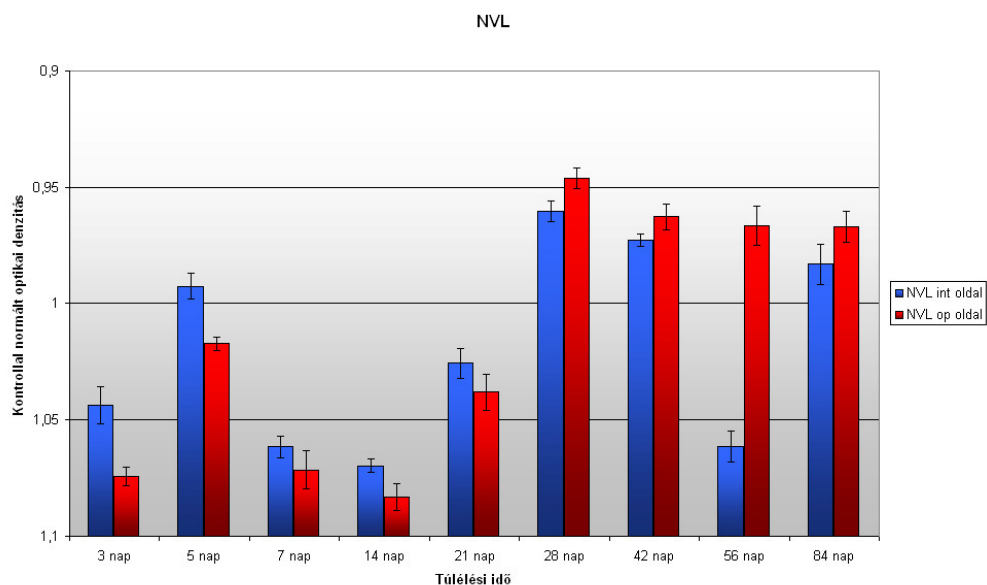
Összehasonlítva a változást az azonos oldali NVM és NVL között, megfigyelhető, hogy a HA próba intenzitása, az ötödik nap kivételével, a NVM-ban gyengébb volt, mint az NVL-ban. Ez a különbség mind az ép, mind az operált oldalon látható volt.

29. ábra. A hyaluronsav eloszlásában megfigyelhető változás a nucleus vestibularis laterálisban (NVL) vestibularis léziót követően. Lépték: 25 μ m

A Fisher-féle exact teszt segítségével kimutattuk, hogy az operált és az ép oldalak között nem független a HA próba intenzitásának változása (NVM: ($p=0,04$; NVL: $p=0,004$; TZ: $p=0,004$). Ez arra utal, hogy az operáció az intact oldalon végbemenő HA denzitás változásokat is befolyásolja és annak időbeli lefutása is hasonló az ép és az operált oldalon.



5. grafikon. A hyaluronsav reakció optikai denzitásának változása a nucleus vestibularis lateralisban (NVL) vestibularis léziót követően.

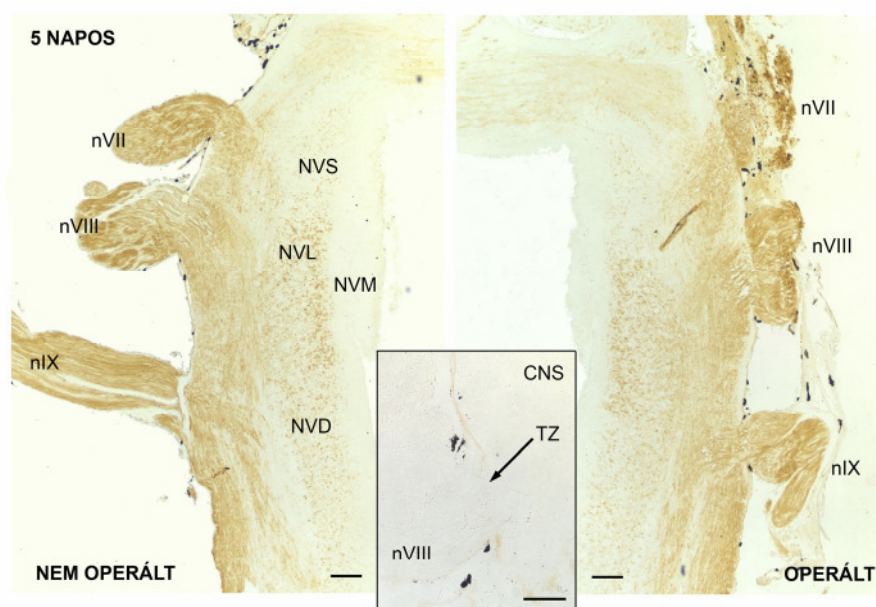


6. grafikon. A hyaluronsav reakció optikai denzitásának változása a mnucleus vestibularis medialisban (NVM) vestibularis axotómiát követően.

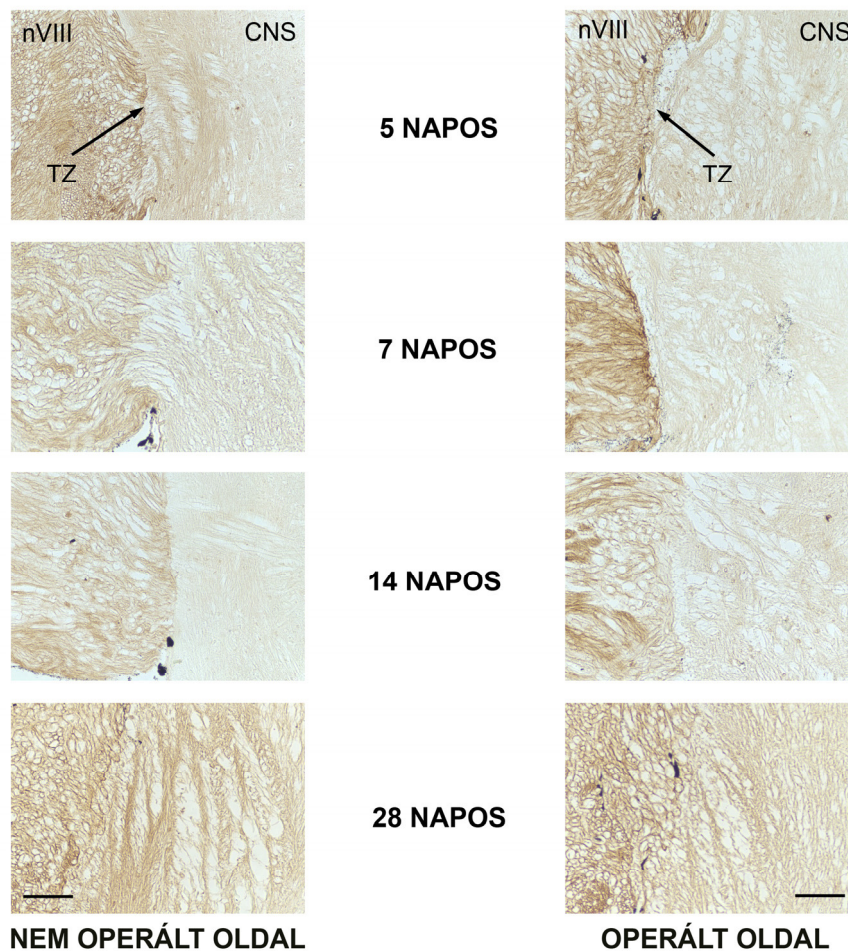
A NVD és az NVS területén is megfigyelhető volt a PN dezintegrációja majd reintegrációja a másik két maggal nagyjából azonos időbeli lefolyással. Ezekben a magokban azonban nem végeztünk optikai denzitás mérést, mivel a regeneráció szempontjából az NVL-nek és az NVM-nek van fontosabb szerepe, ugyanis ebben a két magban figyelhető meg a legnagyobb mértékű változás a regeneráció során.

6.5.3. A laminin eloszlási mintázatának változása post-ganglionáris vestibularis axotómiát követően

Vestibularis axotómiát követően vizsgáltuk a **laminin** eloszlásában bekövetkező változásokat is, azonban ezt csak a 28. postoperatív napig követtük. A legmarkánsabb változást az 5. postoperatív napon észleltük, amikor a laminin IR intenzitása mind a perifériás idegekben, mind azok belépési zónájában megemelkedett mind a két oldalon. Emellett, szemben a normál állapottal, a laminin megjelent a központi idegrendszerben is, ahol mind az ép, mind az operált oldalon intenzív laminin reakciót mutattunk ki az agytörzsben, a tractus vestibulocerebellaris és a tractus vestibulospinalis normál lefutásától lateralisán. Pozitív laminin IR-t látunk mindkét oldalon a vestibularis magok neuropiljében, a NVM kivételével. A NVL-ban valamivel erősebb volt a reakció intenzitása, mint a NVS-ban és a NVD-ben (30. ábra).



30. ábra. A laminin eloszlásának változása az agytörzsben az 5. postoperatív napon a vestibularis léziót követően. A betét az operált állatokból származó metszeteken végzett immunhisztokémiai reakció negatív kontrollja. Lépték: 50 μ m



31. ábra. A laminin eloszlásában megfigyelhető változás a nervus vestibulocochlearis belépési zónájában (TZ) vestibularis léziót követően. Lépték: 50 μ m

Ezt követően a laminin reakció intenzitása csökkenő tendenciát mutatott. A 7. postoperatív naptól a periférián és a belépési zónában az ép oldalon csökkent, míg az operált oldalon továbbra is magas volt a reakció intenzitása. Eközben a tractus vestibularistól laterálisan elhelyezkedő területen a laminin IR intenzitása csökkent, és csak a 28. postoperatív napon mutatott kisebb emelkedést, azonban ez kevésbé volt intenzív, mint az 5. postoperatív napon észlelt reakció erőssége. A 14. napra a laminin IR intenzitása a nervus vestibulocochlearis perifériás részében illetve annak belépési zónájában is a nem operált állatokhoz hasonló erősségűre csökkent és a későbbiekben itt változást nem észleltünk. Később a laminin eloszlása a központi idegrendszerben normalizálódott, azaz a normál állapotokhoz hasonlóan laminint ezen a területen nem tudtunk kimutatni (31. ábra). A laminin esetében megfigyelhető expressziós változást optikai denzitás méréssel nem vizsgáltuk.

7. MEGBESZÉLÉS

7.1. A nucleus vestibularis descendens szekunder vestibuláris neuronjainak anterográd kapcsolatai

Kísérleteinkben neurobiotint injektáltunk a nucleus vestibularis descendens rostralis részébe, és vizsgáltuk e mag anterográd és retrográd kapcsolatait a központi idegrendszer struktúráival. Kísérletsorozatunk eredményei alátámasztják a korábbi – elsősorban élettani kísérleteken alapuló – adatokat, illetve új, **eddig csak részben vagy egyáltalán nem ismert kapcsolatokat sikerült kimutatnunk.**

7.1.1. A NVD kapcsolatai a diencephalicus központokkal

A NVD legrostralisabb projekcióját a **diencephalonban** találtuk patkányban, hasonlóan a többi vestibularis maghoz [19]. Tankönyvi adat, hogy emlősökben a **thalamus** akusztikus, somatosensoros, visualis és vestibularis bemenetet fogad. Patkányban a diencephalonban végződő vestibularis rostok többségét a thalamus caudalis harmadában találtuk, elsősorban a nucleus ventralis posteromedialisban (VPM). Ez összhangban van azoknak a korábbi vizsgálatoknak az eredményeivel, miszerint a nucleus posteroventralis thalami a vestibularis rostok elsődleges végződési helye [19,20]. Ismeretes, hogy a fő somatosensoros pályák, a lemniscus medialis és a tractus spinothalamicus ugyancsak VPM-ben végződnek. Fiziológiai kísérletek szerint ezek a területek az izmok és ízületek proprioceptorai felől ingerelhetők majmokban [149]. Mindezek alapján elmondható, hogy a thalamus posteroventralis része a somaticus és a vestibularis bemenetek fontos integratív központjának tekinthető és ilyen módon lényeges szereppel bír a testhelyzet fenntartásában. Rostokat és terminálisokat találtunk a **nucleus gustatoriusban** is. Nincs közvetlen adat arra, hogy a patkány thalamus nucleus gustatoriusában végződő vestibularis rostoknak mi lehet a szerepe. Ez a mag a nem specifikus thalamicus magok közé tartozik, és a hippocampus felé projiciál [150]. Feltételezik, hogy a hippocampus egyes neuronjai szerepet játszanak a térbeli orientációban [151], így a nucleus gustatorius közvetítő lehet a vestibularis információ hippocampus felé való továbbításában. A **zona incerta** területére a vestibularis rostokon kívül a spinalis trigeminus magból, a hátsó kötegi magokból és a kisagyi magokból is érkeznek rostok [152]. Ilyen módon a diencephalonnak ez a

magja is egy integratív központ a különböző érző modalitások számára. A rostok közül néhányat a corpus geniculatum mediale (CGM) területére is követni tudtunk. Ismert, hogy a CGM emlősökben az akusztikus rostok végződési helye, de vestibularis rostokat is fogad [153]. A CGM a hallópálya egyik relé magja, és az itt végződő vestibularis rostok kapcsolata a hallópálya rostjaival valószínűleg abban lehet fontos, hogy a hanginger lokalizációjakor a fej helyzete megváltozik, és a vestibularis rendszer kompenzáló működése válik szükségessé.

7.1.2. A NVD kapcsolatai a mesencephalikus központokkal

A **mesencephalon** területére érkező rostokat a korábbi leírásoknak megfelelően a FLM-ban találtuk bilaterálisan. A NVD rostjai még a rhombencephalonban kereszteződtek és csatlakoztak a kétoldalon futó FLM-hoz, de emellett találtunk kereszteződő rostokat a basis mesencephali területén is.

A szekunder vestibuláris neuronok egyik fő végződési területe a **szemmozgató agyidegi magok**. Az oculomotorius és trochlearis magokban végződő rostokat a korábbi leírásoknak megfelelően megtaláltuk mindkét oldalon [10,12]. A végzések száma kevesebb volt, mint a NVS és a NVM esetében [19]. Ez a leletünk alátámasztja azokat a fiziológiai megfigyeléseket, amelyek szerint a vertikális szemmozgások szabályozásában elsősorban a NVS-nak és a NVM-nak van fontos szerepe, míg ebben a vonatkozásban a NVD szerepe kisebb [154].

Eredményeink alapján a NVD másik fő mesencephalikus végződési területe a mozgató rendszerhez tartozó egyik fontos átkapcsoló állomás, a **nucleus ruber** volt. Új eredményként értékelhetjük, hogy az injekcióval ellentétes oldalon gazdag terminalis területet találtunk a nucleus ruber parvocellularis és magnocellularis részében. Hasonló projekció volt megfigyelhető a NVM és a NVS területéről is [19]. A vestibularis rendszer nucleus ruberbe történő projekciójáról tudomásunk szerint korábbi leírások nincsenek. A nucleus ruber corticalis és cerebellaris rostokat fogad, innen indul a rubrospinalis, rubrobulbaris és a rubroolivaris pálya is. A parvocellularis rész elsősorban a kisagy nucleus dentatusból kap bemenetet és a fasciculus tegmentalis centralison keresztül az oliva inferiorban végződik, ami visszavetíti a kisagyba. Ennek a neuronális körnek a legfőbb kimenete a rubrothalamicus pálya, amely végül a motoros, premotoros és parietalis kéregben végződik. A kérgi területek a corticorubralis és corticomesencephalicus pályákon keresztül reciprok kapcsolatban vannak a nucleus ruberrel [155]. A magnocellularis rész elsősorban a nucleus dentatusból fogad rostokat, amelyek a

sejttesten és a proximalis dendriteken végződnek, míg a csekély számban jelen lévő agykérgi eredetű terminálisok a distalis dendriteken végződnek. A rubrospinalis pálya a nucleus ruber pars magnocellularisából ered. A mi leletünk azt jelentheti, hogy a vestibularis rendszer nemcsak indirekt módon, hanem közvetlenül is befolyásolja a nucleus ruber működését.

A **periaqueductalis szürkeállomány** (PAG) területén megtaláltuk a NVD-ből eredő rostok végződéseit, hasonlóan a másik három vestibularis maghoz. Ezeknek az összeköttetésnek feltehetően szerepe van a mozgás koordinációjában. A PAG kapcsolatban áll az idegrendszer számos területével, így a benne végződő vestibuláris eredetű rostok módosító hatást gyakorolhatnak a legkülönbözőbb idegi működésekre. Irodalmi adatok szerint a PAG elektromos ingerlése facilitálja azokat a válaszokat, amelyeket a mély hátizmokban lehet kiváltani a NVL ingerlésével [156]. A PAG szerepét a vestibularis rendszer működésében alátámasztja az az adat, amely szerint labyrinthectomia után megnő a *c-fos* gén aktivitása a PAG-ban [157].

7.1.3. A NVD kapcsolatrendszere a rhombencephalonban

A vestibularis magok közötti kapcsolatrendszer. A rhombencephalonban a vestibularis rendszer egyik fontos kapcsolata az azonos és ellenoldali vestibularis magok közötti összeköttetés. A NVD-ből eredő neurobiotinnal jelölt rostok legnagyobb részét az ellenoldali vestibularis magokban találtuk, míg az azonos oldaliban kevesebbet. Ezen eredmények alapján úgy tűnik, hogy a patkány vestibularis magjai közötti **commissuralis** kapcsolatok kialakításában a NVD illetve a NVM [19] vesz részt a legerősebben hasonlóan a macskákban találtakkal [29,34]. E kapcsolatok létezését fiziológiai és más morfológiai módszerekkel is igazolták [30,31]. A vestibularis magokat összekötő commissuralis projekció különösen fontosnak látszik a labyrinthus irtást követő tünetek kialakulásában. A lézió oldalán kialakuló neuronális aktivitás megszűnéséhez, legalábbis emlősökben, hozzájárulhatnak a kétoldali vestibularis magokat összekötő gátló működésű commissuralis rostok, amelyek az ép oldal felől hiperaktívvá válnak, és gátolják a sérült oldali vestibularis sejteket [32]. A commissuralis gátlásban a GABA szerepe valószínűsíthető, amely GABA_A receptorokon keresztül fejti ki hatását [158], de a tünetek kialakulásához hozzájárulhat az NMDA receptorok szintjének változása a két oldal között [159]. A vestibularis bemenet hiánya valamelyest kompenzálható a commissuralis és az internuclearis rostok felől érkező fokozott aktivitással [35]. A NVD igen erős **intrinsic** kapcsolatot létesít az azonos oldali vestibularis magokkal a rhombencephalon szintjében.

Emlősökben ennek a kapcsolatrendszernek a leírása különböző arra vonatkozóan, hogy az egyes magok milyen mértékben vesznek részt benne [34]. Arról, hogy az intrinsic összeköttetésben interneuronok, vagy a secunder vestibularis neuronok kollateralisai vesznek-e részt, nincsenek morfológiai adatok. Fiziológiai vizsgálatok azt sugallják, hogy az összeköttetésben döntően interneuronok vesznek részt [160].

A NVD és a formatio reticularis kapcsolata. A rhombencephalon egész területén erőteljes projekciót találtunk a NVD-ből a formatio reticularis területére, mely alátámasztja azoknak a vizsgálatoknak az eredményeit, melyek szerint a vestibularis rendszer nem közvetlenül, hanem a formatio reticularison keresztül befolyásolja a vegetatív idegrendszer működését. Ezt a következtetést alátámasztják azon eredményeink is, melyek más vizsgálatokhoz hasonlóan [1] aránylag kevés vestibuláris eredetű terminálist találtak a nucleus dorsalis nervi vagiban és a nucleus tractus solitariiben [27]. A NVD-ből eredő legtöbb rost a híd formatio reticularisának dorsomedialis részére projiciált, hasonlóan a másik három maghoz. Fiziológiai adatok szerint ez a terület a gerincvelői motoneuronok aktivitását befolyásolja [27], aminek alapján arra következtethetünk, hogy a vestibularis rendszer a formatio reticularison keresztül igen erőteljes befolyást gyakorol a motoros szabályozásra. Erőteljes projekciót találtunk a NVD-ből a formatio reticularis dorsolateralis részébe. Irodalmi adatok szerint a formatio reticularisnak ez a része, amit lateral tegmental field-nek is neveznek, a légző és vasomotoros működések szabályozásban játszik fontos szerepet [27]. Leleteink azt a következtetést engedik meg, hogy ezen funkciókra a NVD hatása erőteljes. A formatio reticularis területén talált erőteljes vestibularis projekció megerősíti azokat a korábbi vizsgálatokat, amelyek szerint a vestibularis rendszer befolyása a vegetatív működésekre a formatio reticularison keresztül érvényesül. Ezt igazolja az a leletünk, mások adataival megegyezően [1,27], hogy aránylag kevés rost végződik a vestibularis magokból a nucleus tractus solitariiban és a nucleus dorsalis nervi vagiban. A formatio reticularis dorsolateralis részét egyes leírások "vomiting" nucleusnak nevezik mivel az itt lévő neuronokban megnő a *c-fos* gén aktivitása hányás alatt [161]. Az erőteljes vestibularis projekció azt jelentheti, hogy a vestibularis izgalom következményeként kialakuló hányás a formatio reticularis közvetítésével alakul ki.

A NVD kapcsolata egyéb rhombencephalicus központokkal. A nyúltvelő területén igen jelentős a NVD kapcsolata a **nucleus prepositus hypoglossival**. Ez utóbbi mag ipsilateralis túlsúllyal kapja a rostokat a vestibularis magokból. Az innen eredő rostok egy része a cerebellumban végződik és e mag rostokat fogad a gerincvelői nucleus cervicalis centralisból,

ami a gerincvelői primer afferensek felől fogad proprioceptív bemenetet [12]. A nucleus prepositus hypoglossi ily módon a gerincvelői proprioceptív és a vestibularis bemenetek integrálásában és az információ kisagy felé történő továbbításában játszik fontos szerepet [12]. Az oliva inferior területén – ami a nyúltvelő fontos extrapiramidális központja - nem találtunk a NVD-ből eredő rostokat és végződéseket. Ez a leletünk megegyezik a korábbi irodalmi adatokkal, amely szerint az olivocerebellaris kapcsolatokat a NVL-ből érkező információ befolyásolja [22]. Kimutattuk a NVD kapcsolatait az **agytörzsi érző magokkal**. Az azonos oldalon haladó rostok egy része a nspV subnucleus oralisában azon a területen végződik, ahová a nervus mandibularis projiciál. A subnucleus oralis a nspV-nek az a része, ami működését tekintve hasonló a hátsó kötegi magokéhoz. Korábbi kísérletek azt bizonyították, hogy a nspV-nek és a hátsókötegi magoknak kiterjedt kapcsolata van a vestibularis magokkal [162], és ezekben a magokban a vestibularis input erősen befolyásolja a nyaki izomzathoz érkező sensoros információ feldolgozását. Nelson és mtsai [163] azt találták, hogy ezek a vestibulotrigeminális rostok collateralisai a vestibulo-olivaris rostoknak, melyekben GABAerg terminálisok gátló funkciót töltenek be. A NVD medial felé haladó rostjai nagy számban végződnek az azonos oldali abducens magban, néhány rostot az ellenoldaliban is találtunk. Jóllehet az abducens mag kapcsolata a NVM-al a legerősebb, eredményünk azt mutatja, hogy a NVD is szerepet játszhat a horizontális szemmozgásokban.

7.1.4. A NVD gerincvelői kapcsolata

A patkány **vestibulospinalis** projekciójában mind a négy vestibularis mag részt vesz, így a NVD is, amelyből a leszálló rostokat valamennyi funiculusban követni tudtuk bilaterálisan a thoracalis szakaszig. Ez a lelet megerősíti azoknak a vizsgálatoknak az eredményét, amelyek szerint a vestibulospinalis projekció merev széttagolása a klasszikus leírások szerinti a tractus vestibulospinalis medialisra (fasciculus longitudinalis medialis), tractus vestibulospinalisra és az újabban leírt tractus vestibulospinalis caudalisra [23] a valóság túlzott leegyszerűsítését jelenti [26]. Általánosságban elmondható, hogy az eredéstől függetlenül, legnagyobb számban az ipsilateralis funiculus anteriorban és a funiculus lateralis elülső részében találhatunk a vestibularis magokból eredő rostokat, amelyeknek kollaterálisai legnagyobb számban a cervicalis, és lumbosacralis szegumentumokban végződnek és kevesebb található a thoracalis szakaszon. A végzések az I és II Rexed lamina kivételével a szürkeállomány egész területén megtalálhatók, különösen nagy számban a VII, VIII és a IX laminákban. [21,26].

A NVD-ből a nyaki szakaszon a nucleus cervicalis centralis fogadta a legtöbb terminálist az injekcióval azonos oldalon. Ez a mag a nyakizmok izomorsóiból kap bemenetet [164]. A fasciculus longitudinalis medialis leszálló rostjai a nyaki gerincvelő területén a tarkó és nyakizmok beidegzését látják el, ezáltal a testmozgások során a fej megfelelő kompenzáló elmozdulását okozzák [9]. A újabb leírások ezt még tovább pontosítják, melyek szerint a gerincvelő elülső szarv medialis részén az axialis izomzat motoneuronjai helyezkednek el, és ezek közvetlen vestibularis hatás alatt állnak [165].

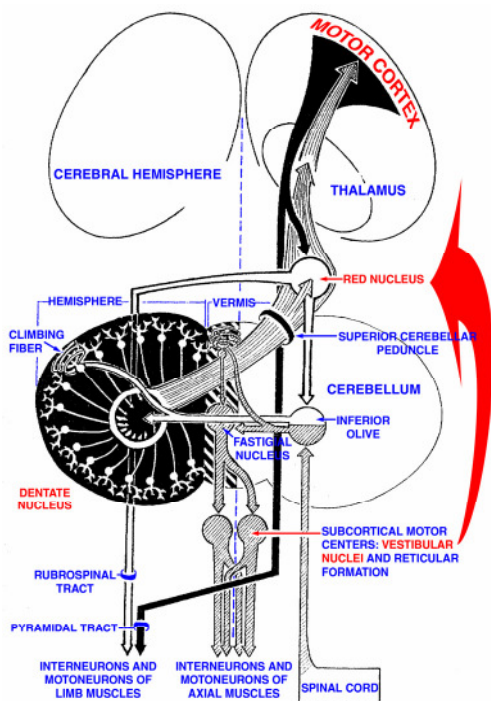
7.2. A NVD retrográd kapcsolatai

Korábbi leírásokban nem találtunk adatokat a NVD-ba projiciáló sejtek elhelyezkedéséről és morfológiájáról. Eredményeink szerint a retrográd úton jelölődött sejtek mindig olyan helyen voltak, ahová a NVD is küldött rostokat: így a rhombencephalon rostralis és caudalis részében, elsősorban a formatio reticularis területén, a nspV-ben, a nucleus tractus solitariiben és a nucleus prepositus hypoglossiban. Ezek mellett retrográd jelölődött sejtek voltak az ipsi-, és contralateralis vestibularis magokban is. Retrográd jelölődött sejteket a diencephalonban, a mesencephalonban és a gerincvelőben nem találtunk

Eredményeink összegzéseként megállapíthatjuk, hogy az alkalmazott jelölőanyag segítségével a NVD olyan kapcsolatait is sikerült kimutatnunk, melyek más jelölési technikák alkalmazása mellett rejtve maradtak. A vestibularis magrendszer projekciójának ismerete hozzásegíthet ahhoz, hogy a gyakran előforduló vestibularis zavarok és az ezt követő kompenzáció mechanizmusának neuronális hátterét megérthessük.

A másodlagos vestibularis neuronok projekciójáról fontosnak tartjuk kiemelni, hogy kimutattuk a vestibularis rostok végződését mindazonokon a területeken, ahová az irodalmi adatok szerint a proprioceptív impulzusok is érkeznek: a thalamus különböző magjai, cerebellum, nucleus prepositus hypoglossi, hátsó kötegi magvak és a gerincvelő hátsó szarva. Úgy gondoljuk, hogy a kétféle sensoros modalitás konvergenciája fontos lehet a test egyensúlyi helyzetének megtartásában.

7.3. A nucleus vestibularis superior kapcsolata a nucleus motorius nervi oculomotorii-vel és a nucleus ruber-rel elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján



32. ábra. A vestibularis magok és a nucleus ruber közötti kapcsolatok. Piros nyíllal jelöltük az általunk leírt vestibulorubralis projekciót.

A nucleus vestibularis superior terminalisainak megjelölésére *Phaseolus vulgaris* - leukoagglutinin (PHA-L) használtuk, amely sokkal vékonyabb rostok jelölésére is alkalmas, mint a korábbi gyakorlatban alkalmazott tormaperoxidáz [26]. Fiziológiai vizsgálatok azt mutatták, hogy a vestibularis magok közül a **nucleus vestibularis superior** adja a legerősebb projekciót az oculomotorius maghoz [166].

Kísérleteinkben mi is hasonló kapcsolatot mutattunk ki a NVS és az azonos oldali oculomotorius mag között [21]. Elektronmikroszkópos vizsgálatainkban azt találtuk, hogy a NVS-ből eredő efferensek szimmetrikus, axosomatikus és axodendritikus kapcsolatokat alakítanak ki az oculomotorius magban. A PHA-L jelölt boutonok nagy része GABA pozitív volt, amely alátámasztja a fiziológiai vizsgálatok eredményeit [7]. Macskán végzett fiziológiai kísérletekkel igazolták, hogy a vestibuláris ideg ingerlésekor GABA antagonisták alkalmazásával megakadályozható a gátló posztzinaptikus potenciálok (IPSP-k) kialakulása az oculomotorius magban [167]. Nyulakon végzett vizsgálatokban kimutatták az NVS-nek gátló hatását az ipsilateralis oculomotorius magban. A NVS felől érkező rostok és az oculomotorius mag idegsejtei között fennálló szinaptikus kapcsolatok több mint 90%-át GABAerg jellegűnek találták fiziológiai módszerekkel [15]. Irodalmi adatok szerint más vestibularis magból is eredhetnek olyan GABAerg efferensek amelyek a nucleus oculomotoriuson végződnek [168]. Vizsgálataink során olyan GABA pozitív terminálisokat is találtunk, amelyek nem voltak PHA-L-el jelölve. Ezek a terminálisok feltehetően az un. supraoculomotor területéről eredhetnek, amely fontos szerepet tölt be a szemmozgások szabályozásában majmokban [169]. A GABA pozitív dendritik

és sejttestek valószínűleg azokhoz a GABAerg interneuronokhoz tartoznak, amelyeket macskák és a majmok oculomotorius magjában már korábban kimutattak [166].

A **nucleus ruber** magnocelluláris részében a NVS-ből eredő efferensek szimmetrikus GABAerg szinapszisokat alakítanak ki, a terminálisok sejttesteken és dendriteken végződnek. A nucleus rubernek kiterjedt kapcsolatai vannak a központi idegrendszer egyes területeivel, és ez a mag a motoros funkciók koordinálásában játszik fontos szerepet. Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a nucleus ruber-be érkező kisagyi jeleket, melyek a thalamusba és a formatio reticularisba továbbítódik, a vestibuláris rendszer aktivitása valószínűleg képes direkt módon szabályozni. Jelen vizsgálataink alapján a NVS által kiváltott ilyen jellegű szabályozás GABAerg gátláson keresztül valósul meg. (32. ábra). A vizsgálataink során a nucleus ruberben talált PHA-L jelölést nem tartalmazó GABA pozitív terminálisok eredete ismeretlen, a GABA pozitív sejttestek feltehetően interneuronok.

7.4. Az idegrendszerben előforduló extracelluláris mátrix makromolekulák és receptoraik; lehetséges szerepük a vestibularis regenerációban

Vizsgálatainkban az ECM makromolekulái közül a hyaluronsav, a laminin, a tenascin, a fibronectin és a phosphacan eloszlását tanulmányoztuk felnőtt békák idegrendszerében. Korábbi vizsgálatokban a tenascin, a fibronectin és a laminin jelenlétét mutatták ki kételtűek idegrendszerének egyes részein, viszont részletes térképek eddig nem készültek [170]. Jelen kísérleteinkben először mutattuk ki hyaluronsav és phosphacan jelenlétét a békák idegrendszerében, korábban ez utóbbi két molekulát a központi idegrendszerben csak emlősökben és madarakban mutatták ki [171]. Béka idegrendszerében elsőként mutattuk ki a dystrophin-glycoprotein komplex molekulái közül a dystrophint és a β -dystroglycant.

7.4.1. Hyaluronsav

A HA reakció negatívnak bizonyult felnőtt békák perifériás idegrendszerében, ugyanakkor kimutattuk a központi idegrendszer különböző területein. A HA szerepéről az idegrendszer normál és kóros működése kapcsán megoszlanak a vélemények. Az axon növekedésben betöltött permisszív szerepe bizonyított patkányok perifériás idegeiben, ezzel szemben gátló szerepét mutatták ki patkányok látóidegének regenerációjában [42]. Özgenel

kimutatta, hogy a HA-al kezelt perifériás idegekben a regeneráció során csökkent a hegszövet mérete és javult a regenerációs készség [93]. Ennek az lehet a magyarázata, hogy a HA olyan mikrokörnyezetet hoz létre amely magas viszkoelasztikus tulajdonsággal bír, és ez megakadályozza azt, hogy fibrózis alakuljon ki. A **vestibularis axotomiát** követő regeneráció során az átvágott **VIII. agyideg** perifériás részén megemelkedett HA expressziót láttunk. Ez a lelet újabb bizonyítékkal szolgál arról, hogy a perifériás idegekben a HA permisszív hatása az axonnövekedésre.

A perifériás és a központi idegrendszer határán lévő **átmeneti zónában** a HA reakció erős volt ép állatokban, erősebb, mint a belépés utáni fehérállomány területen. Ez az eredmény összhangban van azokkal az irodalmi adatokkal, amelyek a TZ barrier funkciójáért a benne lévő nagy mennyiségű CS-PG-okat, hyaluronsavat és a tenascin C-t teszik felelőssé [122-124]. **Vestibularis axotomiát követően** a TZ területén a HA reakció intenzitásának fokozódását és további növekedését figyeltük meg a regeneráció kezdetén az operált és az ép oldalon is. Átmeneti csökkenés után újabb emelkedés következett, majd fokozatos csökkenést követően az értékek a normál állatokban mértéknél valamivel magasabb szinten stabilizálódtak. A HA reakció változását a TZ esetében jelenleg nem tudjuk magyarázni. Az intenzitás változásának időbeli lefolyása azt sugallja, hogy az általunk vizsgált modellben a HA permisszív hatást fejt ki axonregeneráció során. Az intenzitás növekedése azt is jelentheti, hogy a TZ-ben szabadon található a HA, és nem képez aggregátumot, hasonlóan az embrionális szövetekhez, ahol szerepe permisszív [62]. Lehetséges, hogy az axon-növekedési kúp felszínén expresszálandó receptorokhoz hozzá tud kötődni a szabad HA, amely egyes jelátviteli folyamatokon keresztül képes fokozni az axon növekedését [172]. A kérdés megválaszolásához további kísérletekben szükséges vizsgálni azoknak a lectikánoknak az expresszióját, amelyek HA kötő domainnel rendelkeznek. További értékes adatokat szolgáltathatnak azok a tervezett vizsgálatok is, amelyek során a HA receptorait, valamint a HA és egyéb ECM makromolekulák jelátviteli folyamatokban betöltött szerepét fogjuk vizsgálni.

A központi idegrendszerben a HA a **szürkeállományban** a neuropilben és egyes magcsoportokban pericellularisan volt jelen, a **fehérállományban** pedig az axonok körül. A magasabb rendű gerincesekben megfigyelt hasonló eloszlás arra utal, hogy a hyaluronsav idegrendszerben betöltött szerepe valószínűleg hasonló a különböző fajokban [42].

A **szürkeállomány** területén a HA reakció intenzitása pericellularisan jóval erősebb volt, mint a neuropilben. Ez az eredmény arra utal, hogy a HA, hasonlóan más fajokhoz, békában is

fontos szerepet játszik a PN alkotásában [40,108,109]. A PN-ben a HA-nak kettős szerepe lehet: receptorain keresztül kapcsolódik a sejtekhez, illetve különböző proteoglycanokat kapcsol a sejthez. A hyaluronsav receptorai közül elsősorban a CD44-et és a RHAMM-ot illetve splice variánsait mutatták ki emlősök központi idegrendszerében [173], a HA által kötött PG-k pedig a lectin család olyan tagjai, amelyek HA kötő ún. link modullal rendelkeznek. Ezek az aggrecan, a neurocan, a versican és a brevican [43,45]. Ezeknek a PG-noknak fontos szerepük van a szinapszisok érésében és stabilizálásában [43]. A kialakult PN barrierként viselkedik, amennyiben megakadályozza újabb szinaptikus kapcsolatok kialakulását [108,117]. Vizsgálataink során a vestibularis axotomiát követő kezdeti időszakban csökkent a HA reakció intenzitása a vestibuláris magkomplex területén a neuronok körül. Irodalmi adatok alapján a PN dezintegrációja és az ECM makromolekulák expressziójának csökkenése feltételezhetően szükséges ahhoz, hogy új szinaptikus kapcsolatok alakulhassanak ki [170]. Ez a mi leleltünkben azt jelentheti, hogy a HA csökkenése megváltoztatja a PN molekuláris szerkezetét, és ezáltal lehetővé válik, hogy kiesett vestibularis input kompenzálására axonbenövés indulhasson meg azoknak a pályáknak a kollateralisaiból, amelyek normálisan is kapcsolatban vannak a vestibularis neuronokkal. Ezeknek a kapcsolatoknak a megerősödését fiziológiai vizsgálatokkal bizonyították [33,174]. A HA reakció intenzitásának változása a várakozással és irodalmi adatokkal ellentétben, melyek során a gerincvelőt illetve a gerincvelői hátsó gyökeret sértették és a HA-kötő PG-ok expresszióját vizsgálták [124,175], kétoldali volt nemcsak a TZ területén, hanem a PN-ben is. A kétoldali változás egyik oka lehet az a szisztémás hatás, amit axotomia területén kialakuló regenerációs blasztémában megjelenő sejtek által termelt különböző anyagok hoznak létre. Emellett, vagy ezzel együtt a kétoldali vestibularis magkomplex közötti commissuralis kapcsolatok szerepe is valószínűsíthető. Unilateralis fornix átvágásnál egérben mind a kétoldalon megváltozott a CD44 expresszió a hippocampusban, és a hatás feltehetőleg a cholinerg axonokon keresztül jutott át az ellenoldalra [176]. Ezekben a vizsgálatokban az operált oldalon a CD44 szintjének maximuma a 4. napon volt, aminek a hátterében a CD44 mediálta HA felvétel áll. A sejtbe bejutott HA fontos szerepet kap az Erk és a calmodulin részvételével lezajló jelátviteli mechanizmusokban amely cytoszkeletális változásokhoz vezet [91]. Az intracellularis HA különböző sejtmag fehérjékkel (pl. cdc37, p32) is kapcsolatba kerülhet, és a génexpresszió módosulása a neuronok membránjában megváltoztathatja annak receptor összetételét. Jóllehet békában nem ismerjük a HA receptorait, eredményeink alapján, miszerint a HA expressziója kis mértékben emelkedik az 5. postoperatív

napon, hasonló folyamatokat feltételezhetünk. Ezt erősítik meg azok a vizsgálatok is, amelyekben megemelkedett a CD44 immunreaktivitás erőssége egérben a nervus opticus és hypoglossus átvágását követően mind a motoneuronon, mind az idegrostokon, és a reakció intenzitásának maximuma a 4. napon volt. [172].

Delpech [92] (1989) és munkatársai szerint a HA-hyaluronektin kapcsolatának fontos szerepe van a GABAerg neurotransmisszió szabályozásában. A vizsgálatainkban kimutatott HA intenzitás változás **a vestibularis lézió és regeneráció során** ezzel a működéssel is összefüggésben lehet. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a commissuralis vestibularis kapcsolatok nagy része GABAerg [177], ugyanígy a vestibularis magok és az oculomotorius mag kapcsolata is [2,166]. A GABA és a GABA_A receptor expresszió mértékének vizsgálata a vestibularis axotómiát követően közelebb vihetne a kérdés megválaszolásához.

A HA reakció intenzitásának változása nem ad választ arra a kérdésre, hogy milyen hosszú HA láncok vannak jelen a regeneráció különböző időpontjaiban. In vitro vizsgálatokból ismert, hogy egér ectoderma és fibroblast sejtek, különböző módon reagálnak az őket körülvevő HA mennyiségétől és a HA láncok hosszától függően [178]. Viszonylagosan kevés HA az ECM-ben a sejtek adhézióját segíti, azonban gátolja a sejtek osztódását. Ezzel szemben a sok és/vagy rövid HA inkább a migrációt és a sejtosztódást fokozza. A HA mennyiség és minőség szabályozásának egyik lehetősége a különböző HAS izoenzimek révén valósul meg. A HAS2 termeli a legtöbb és nagy molekulatömegű HA-t, míg a HAS1 a legkevesebbet és szintén nagy molekulatömegűt. A HAS3 produktuma mennyiségét nézve a HAS2 –höz hasonló, de a HA láncok kis molekulatömegűek [179]. A HAS különböző izoenzimeinek vizsgálata a regeneráció során egy másik irányba történő folytatása lehet a jelen munkának.

7.4.2. Laminin

Normál (nem operált) békákban **laminint** csak a perifériás idegekben, azok belépési zónájában, illetve a központi idegrendszeri erek lamina basalisában és az agyburkokban tudtunk kimutatni. A belépési zónában hasonló laminin eloszlást és szöveti szerkezetet találtak patkányok esetében is a gerincvelői dorzális gyökereinél, amelyet central tissue projection-nek (CTP) neveznek, mint amelyet jelen kísérleteinkben kimutattunk békákban [180]. Vestibularis axotómiát követően a laminin immunreakció intenzitása növekedett a regenerálódó VIII. agyideg perifériás részén és a belépési zónában, ami a molekula permisszív tulajdonságaira lehet újabb bizonyíték a perifériás idegrendszerben [181].

Vestibuláris léziót követően a laminin IR pozitív volt a központi idegrendszerben a fehérállományban azon a részen, amely az ép tractus vestibularistól laterálisan helyezkedik el. Ezen a helyen találhatóak a regenerálódott tractus vestibularis rostjai irodalmi adatok alapján és a saját jelöléses vizsgálataink szerint is [5]. A tractus lateralizációja arra utal, hogy az újonnan képződő rostok nem a degenerálódó rostok helyén maradt myelinnel kitöltött területeken haladnak [182]. Irodalmi adatok vannak arról, hogy ebihalban a fejlődés során jelen van a laminin a központi idegrendszerben, felnőtt idegszövetben viszont csak sérülés esetén aktiválódik, és az astrocyták termelik. A felnőtt patkány idegrendszerének egyes területein a laminint folyamatosan expresszálják az astrocyta sejtek, így pl. a bulbus olfactoriusban, ahol a regeneráció felnőtt korban is megfigyelhető [183]. Kísérleteinkben a vestibularis axotómiát követően a laminin a központi idegrendszerben mindkét oldalon kimutatható volt. Ennek okát nem tudjuk, de a HA-nál leírt commissuralis rostokon keresztül érkező jelátvitelnek vagy szisztémás hatásnak fontos szerepe lehet ebben [21,33].

A laminin hatása a központi idegrendszer regenerációja során még nem pontosan ismert. Kimutatták, hogy az integrin receptorhoz kötődő laminin-1 aktiválja a tPA/plasminogén rendszert, amelynek révén az ECM dinamikus és plasztikus változik. Irodalmi adatok szerint a tPA aktiválódása új szinapszisok kialakulásához vezethet [184]. Hippocampuson történt vizsgálatok azt mutatták, hogy a lamininnak fontos szerepe lehet az LTP-k kialakulásában, a tanulásban és a memóriában azáltal, hogy a receptorhoz kötődve módosítja a sejten belüli jelátviteli folyamatokat [185] [185]. A laminin megjelenése a központi idegrendszerben axotómiát követően azért is fontos lehet, hogy axonnövekedésre kifejtett serkentő hatása mellett fokozhatja az új szinapszisok kialakulását illetve a meglévők remodellingjét [186].

Egyes irodalmi adatok említést tesznek a laminin **non-premisszív** hatásáról is. A laminin-1 hatására csökken a citoszólban a cAMP és a protein kinázok mennyisége, ezáltal megváltozik az idegsejtek affinitása a BDNF-hoz, így **gátolt** az idegsejt-nyúlványok növekedése [187].

7.4.3. Tenascin-C

Vizsgálatainkban a **tenascin-C** jelenlétét is igazoltuk a béka központi és perifériás idegrendszerében. A tenascin C eloszlása nagyfokú hasonlóságot mutatott a hyaluronsav eloszlásához. A **perifériás idegekben** kisebb volt a reakció intenzitása, míg a **belépési zónában** intenzívebb reakciót találtunk, ami folytatódott a **központi idegrendszer** fehérállományban is. A neuronok körüli tenascin pozitivitás utal arra, hogy e molekula a PN szerves része békában is.

Mivel jelen munkában a tenascin-C expresszióját csak normál állatokban vizsgáltuk, **lehetséges szerepéről a béka idegrendszerében** csak feltételezéseink lehetnek. Emlősökben a tenascin C és R nagy mennyiségben mutatható ki a gerincvelő hátsó gyökerének belépési zónájában, és azt feltételezik, hogy emiatt nem lehetséges az axonregeneráció felnőtt korban a hátsó gyökér sérülését követően [115]. Békában is hasonlóan magas volt a tenascin C reakció intenzitása a belépési zónában, azonban kérdéses, hogy milyen változás következik be axonregeneráció során. Irodalmi adatok alapján a tenascin-C molekulák elsősorban a sejtmigrációban játszanak serkentő szerepet, jelenlétüket kimutatták a kisagyi granulásos sejtek Bergmann glia menti vándorlásában [70]. Felnőtt korban a tenascin-C az idegrendszer azon területein expresszálódik, ahol nagyfokú az idegi plaszticitás, így a hypothalamus magjaiban és a szaglós rendszerben [188]. Idegi lézió esetén a tenascin-C re-expresszálódik a felnőtt idegrendszerben is [189]. A tenascin-C és a R izotípus felnőtt idegrendszerben elsősorban gátló hatást fejt ki az axonok növekedésére [190], de az alternatív splice variánsainak növekedést fokozó szerepe van [191]. A nagyszámú és egymásnak ellentmondó irodalmi adatot úgy foglalhatjuk össze, hogy a tenascin-C serkentő, vagy gátló szerepe nagyban függ attól, hogy az adott területen milyen splice variánsok illetve receptorok expresszálódnak.

7.4.4. Phosphacan

Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a **perifériás idegekben** a phosphacan reakció közepes intenzitású volt, de a **belépési zónában** a reakció felerősödött. A **központi idegrendszeri** fehérállományban az axonok körül, illetve a gerincvelőben az axonokban is sikerült phosphacant kimutatnunk. A phosphacan jelenléte egyes neuronok körül azt jelzi, hogy ez a molekula is részt vesz békában a PN kialakításában. A phosphacan elsősorban a Bergmann gliában és a kisagyi sejtjeiben található meg felnőtt patkányokban, de kimutatták az agy és a gerincvelő más területein is [75]. A phosphacan, hasonlóan a többi CS-PG-hoz, a parvalbumint expresszáló GABAerg interneuronok körül mutatható ki leggyakrabban a tenascin-C-vel, a tenascin-R-rel [62], a hyaluronsavval és a neurocannal együtt [192].

A phosphacan jelenlétét korábban nem vizsgálták a **béka idegrendszerében**, ezért **szerepéről** csak feltételezéseink lehetnek. Mivel a kísérleteinkben a chondroitin-szulfát proteoglycanok közé tartozó **phosphacan** eloszlását a központi idegrendszer szürke- és fehérállományában hasonlónak találtuk a felnőtt és újszülött patkányban leírtakhoz [75] feltételezhetjük, hogy a phosphacan szerepe békában is hasonló lehet. A lektikánok, köztük a

phosphacan fontos szerepet játszik az idegrendszer fejlődése során a sejt-adhézióban, a sejt migrációban és az idegnyúlványok fejlődésében. A chondroitin-szulfát (és egyes esetekben a keratán-szulfát) epitópok barriert képeznek az axonnövekedéssel szemben [55,56,63], így irányító szerepet töltenek be. Mind a **négy lektikán** (aggrecan, versican, neurocan és bervican) **gátolja az axonnövekedést**, azonban szerepük nem minden esetben gátló. A proteoglycanok chondroitin szulfát oldalláncai közül a DSD-1-PG (melyet **phosphacannak** is nevezünk) **serkenti az axonnövekedést** [77]. A CSPG-ok core proteinje önmagában is hatással van az idegnyúlványok növekedésére [76]. Ezáltal elmondhatjuk, hogy a lektikánoknak mind gátló, mind serkentő hatása is lehet az axonnövekedésre, mivel chondroitin-szulfát oldalláncaik gátolják, core proteinjeik pedig serkentik az idegnyúlványok növekedését [47,57,58].

7.4.5. Fibronektin

Vizsgálataink során kimutattuk a fibronektin jelenlétét a béka **perifériás idegrendszerében**. Emlősökben azt találták, hogy a perifériás idegrendszerben a fibronektin a vestibuláris Schwann sejtek osztódásának elindításában fontos szerepet játszik, ugyanakkor nincs hatással a nervus ischiadicusban lévő Schwann sejtek osztódására [193]. A fibronektin reakció intenzitása emelkedett a **belépési zónában**. A **központi idegrendszer fehérállományban** a fibronektin reakció gyengébb volt, kivéve a gerincvelői commissuralis rostok lefutásának megfelelő területet és az agytörzsi fehérállomány ventralis, felszínhez közeli részét. Ez utóbbi az a terület, ahol a kereszteződő vestibulocochlearis commissuralis rostok futnak. A fibronectin fehérállományon belüli egyenlőtlen eloszlásnak nem tudjuk a magyarázatát, de elképzelhető, hogy a commissuralis rostok területén más a gliasejtek megoszlása. Irodalmi adatok szerint a fibronektint az astroglia sejtek termelik. Az idegrendszer fejlődése során az astrocyták serkentik az axon növekedést, amit az általuk termelt fibronektinnek tulajdonítanak [194]. Később az astrocyták elveszítik axon-növekedés serkentő képességüket. Az astrocytáknak mind axon-növekedés serkentő, mind gátló hatása is ismert, a serkentő hatásért a fibronektint teszik felelőssé [195]. Egyes irodalmi adatok szerint a központi idegrendszer neuronjainak növekedése gátolt fibronektin jelenlétében. A fibronektin kettős hatása azzal magyarázható, hogy több kötő régióval is rendelkezik, és attól függően változik meg a hatása, hogy a sejtek, amelyekkel kapcsolatba kerül, milyen receptorokat expresszál [95]. A **szürkeállomány** területén a fibronectin reakció intenzitása általában gyenge volt. Bizonyos idegsejtcsoportok cytoplazmájában való megjelenése arra utal, hogy békában a neuronok is termelnek fibronectint [196].

7.5. A perineuronal net (PN) változása a vestibuláris regeneráció során

Jóllehet az egyes molekulák tárgyalásánál röviden érintettük a PN-et és a TZ-t, a következő két alfejezetben a vestibularis regeneráció során kapott eredményeinket összevetjük a PN-el és TZ-vel kapcsolatos legfontosabb irodalmi adatokkal.

Eredményeinkben jól látható, hogy az axotómiát követően a PN dezintegrálódott a vestibularis neuronok körül, amely arra utalhat, hogy a szinaptikus kapcsolatok megszűnnek és a stabilitást biztosító makromolekulák hálózata szétesik. A későbbiek során a fellazult szerkezetű PN barrier funkciójának megszűnése teszi lehetővé, hogy a regenerálódó rostok újabb szinapszisokat alakíthassanak ki. A regeneráció végső fázisában, amikor az új szinapszisok valószínűleg már kialakultak, a PN területén a vizsgált molekulák intenzív reakciót mutattak, ami arra utal, hogy a makromolekuláris szerkezet reorganizálódik. Az eredményekből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a PN jelenléte illetve hiánya jelentősen determinálja a regeneráció eredményességét. A PN szinaptikus kapcsolatok stabilizálásában betöltött szerepét több kísérletben igazolták. A PN elbontható a bakteriális chondroitináz enzim segítségével, mely a chondroitin-szulfát glycosaminoglycan oldalláncokat hasítja le, megőrizve a PG és glycoprotein kapcsolatokat. Ez az enzim emellett bontja a HA-t is. A PN elbontását követően az idegsejtek elméletileg szabadabb interakcióba léphetnek egymással, és nyúlványaik, az axonok és dendritek, szabadabban nőhetnek. Ebben az új környezetben új szinapszisok alakulhatnak ki, illetve régebbiek degradálódhatnak. Ez az elmélet az alábbi két eredménnyel is alátámasztható. Az axon-növekedés serkenthető excitatorikus impulzusokkal abban az esetben ha előzőleg a PN komponenseit enzimatikusan eltávolítják, illetve a postnatalis életben az ECM molekulák mennyisége emelkedik a központi idegrendszerben és ezzel párhuzamosan csökken az idegrendszer plaszticitása [71]. A PN-nel borított idegsejtek felszínén újabb szinaptikus kapcsolatok nem tudnak kialakulni [108,117,197].

A PN szerkezetét, és ezáltal a szinaptikus kapcsolatok kialakításának gátlását több, a sejtek által termelt makromolekula és enzim befolyásolhatja. A PN-ben a következő makromolekulákat mutatták ki: versican [53], brevican [65], neurocan [192], Cat-301, phosphacan (DSD-1-PG), [118], hyaluronsav [40], tenascin-C és a tenascin-R [65]. Egyes elképzelések szerint a PN területén egy ún. hyaluronsav-lectikán-tenascin komplex (HLT) alakul ki. A HLT modell szerint a HA háló kötésének erősségét a lektikánok segítségével lehet szabályozni. Azok a lektikánok, amelyeknek nagyobb az affinitása a tenascin-R-hez, illetve

rövidebb centrális doménnel rendelkeznek szorosabbra tudják kötni a HA hálót. Ezzel szemben a lektikánok és a tenascin-R közötti kapcsolat gyengülésével, vagy a lektikán-HA kötés csökkenésével „lazábbá” válik a mátrix. Ez utóbbi folyamatok kialakulásában fontos szerepe van különböző proteinázoknak, vagy annak, ha kisebb affinitású vagy hosszabb lektikánok expresszálódnak a sejt felszínén. Azzal is el lehet érni a PN alkotóelemei közötti kötés gyengülését, ha relatíve több hyaluronsav expresszálódik a lektikánok számához képest, illetve ha megváltozik a lektikánok GAG oldalláncainak kémiai tulajdonsága. Ugyanis ha az idegrendszerben több brevican expresszálódik, mint aggrecan, akkor az ECM-ben kevesebb chondroitin-szulfát található. A phosphacan még nem vették be ebbe a modellbe [197], azonban egyes irodalmi adatokban, és a mi vizsgálatainkban bizonyos neuroncsoportok körül erős volt a phosphacan reakció, ami a molekulának a PN-be való jelenlétét támasztja alá [198].

A PN sejtspecifikus összetételét a sejtek által termelt aggrecanok, és phosphacanok glikozilációjával is lehet szabályozni. A phosphacan esetében a két fő izoforma abban tér el egymástól, hogy jelen vannak-e, avagy hiányoznak-e a keratán-szulfát oldalláncok, illetve glikozilációtól függően tartalmaz-e HNK-1 és Lewis-X epitópot [199]. A glikozilációban fontos szerepet játszanak a glikozil-transzferáz és a glikozidáz enzimek. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy azonos géntermék eltérő glikozilációjával nagy mértékű biokémiai és funkcionális heterogenitást érhetünk el, amely befolyásolhatja a PN összetételét.

A PN neuroprotektív szerepét hangsúlyozzák azok az adatok, amelyek szerint Parkinson kórban és Alzheimer kórban azok a neuroncsoportok nem, vagy kevésbé károsodnak, amelyek sejtjei körül kifejezett a PN [200].

7.6. A belépési vagy tranzitionális zóna (TZ) változása a vestibuláris regeneráció során

Kísérleteink során azt találtuk, hogy a nervus vestibulocochlearis agytörzsi belépésénél található átmeneti zónában axotomiát követően megváltozott az általunk vizsgált két ECM makromolekula, a HA és a laminin expresszója. A **bHABP** (biotinilált HA próba) intenzitása a léziót követően mindkét oldalon megemelkedett, és maximumát mindkét oldalon a 14. postoperatív napon érte el, majd a 21. postoperatív napra a HA próba intenzitása a nem operált állatokban mért szintre csökkent. Ezt követően már csak kisebb mértékű intenzitásbeli emelkedés volt megfigyelhető az általunk vizsgált időintervallum végéig. A **laminin** IR intenzitásában is emelkedés volt megfigyelhető a vestibularis axotómiát követően mindkét oldalon. A reakció intenzitása az 5. postoperatív napra érte el maximumát, majd a 14. postoperatív napig az IR

intenzitása a nem operált állatokhoz hasonló szintre csökkent, az operált oldalon valamivel lassabban, mint az ép oldalon.

A perifériás idegek központi idegrendszerhez közeli területein, így pl. a hátsó gyökérben, sérülést követően fokozott gliózis figyelhető meg, mely nagyon hasonlatos a központi idegrendszeri sérülést követő reaktív gliozishoz, ami miatt nem lehetséges többek között a központi idegrendszer regenerációja. Ezzel szemben a perifériás idegek kielégítő módon képesek regenerálódni. A perifériás axon-regenerációt nagymértékben befolyásolja az átvágott idegek túlélési képessége, illetve az a miliő, amely serkenti az axonok növekedését. Ezt a perifériás idegrendszerben ECM makromolekulái közül elsősorban a **laminin** biztosítja [201].

Minden dorsalis gyökér tartalmaz egy ún. central tissue projection-t (CTP) vagy központi idegrendszeri nyúlványt [180], ami azt jelenti, hogy a központi idegrendszerre jellemző szöveti struktúra egy szakaszon kinyúlik a perifériás gyökérbe. Ezzel szemben patkányokban a nervus vagus belépési zónája (vDREZ = vagal dorsal root entry zone) különbözik a többi agyideg és a gerincvelői gyökér belépési zónájától, amennyiben a perifériás idegekre jellemző szöveti struktúra (PTI = peripheral tissue insertions) mélyen (kb. 600-700 μm hosszan) benyúlik az agytörzsbe, és Schwann sejteket illetve astrocyták hálózatát tartalmazza. Ezen a területen felnőtt állatokban is megfigyelhető a perifériás vagus sérülést követően az axonok benövése az agytörzs területére. Az itt található Schwann sejtek laminint expresszálnak, és e sejtek fenotípusosan is különböznek a perifériás idegekben található Schwann sejtektől, és sokkal inkább hasonlítanak az OEC-sejtekre (olfactory ensheathing cells)[202]. A regenerálódó rostok azonban nem minden esetben reinnerválják a megfelelő agytörzsi magokat. Ugyanis a PTI csak kb. az agytörzs és a magok közötti távolság feléig ér, ahol nagy számban találhatóak olyan erek, amelyek a pedunculus cerebellaris inferior és a tractus spinalis nervi trigemini között futnak a nucleus paratrigeminalisig és a nucleus cuneatus externusig. A regenerálódó rostok tehát a PTI-t elhagyva a laminint expresszáló endothel sejtek mentén nőnek az előbb említett magok irányába. A nervus vestibulocochlearis belépési zónájára békákban nem jellemző a patkányok nervus vagusánál megfigyelhető szöveti szerkezet, azonban az előbbieken leírt példa is kiemeli a laminin axonnövekedést serkentő szerepét in vivo. Valószínűleg ezzel magyarázható az, hogy a laminin emelkedett szintje a TZ-ben, illetve a regenerálódó tractus vestibularis mentén elősegíti a regenerálódó rostok benövését a vestibularis magok irányába.

A perifériás idegrendszerrel szemben a központi idegrendszerben az axon-regeneráció meglehetősen nehezített, mivel itt hiányoznak azok a tropikus faktorok, melyek segítenék az

axon-pathfinding-ot. Emellett a regenerációt az oligodendrocyták myelin-termékeinek degradátumai [203], és az astrocyta nyúlványok is gátolják, illetve a sérülést követően a microglia sejtek hegszövetet hoznak létre. A TZ területén lévő barrier a periféria felől benövő axonok számára csak a postembrionalis életkorban alakul ki, és a glia sejtek által termelt ECM molekulákat, elsősorban a **CS-PG-okat** teszik felelőssé az axon benövés gátlásáért. [204]. A CS-PG-ok közül a hyalektinek (brevican, neurocan és a versican V1 és V2 izoformáinak) szintje megemelkedik egerekben a gerincvelői hátsó gyökök sérülését követően. E molekulák expressziójának fokozódása valószínűleg az astrocyták aktiválódásával és egyes oligodendrocyta prekursorok megjelenésével magyarázható, mely sejtek nagymértékben termelik ezen hyalektineket. Ugyan egyes CS-PG-ok (versican V1 izoforma) mRNS-ének szintje a léziót követően hamar lecsökkent, azonban e molekulák turnover-e meglehetősen lassú, ezért axonnövekedés gátló hatásukat sokáig kifejtethetik. A léziót követően a brevican és a versican szintje is megemelkedik a perifériás idegben a gliaheg környékén [124], azonban a megemelkedett laminin és tenascin C expresszió ellensúlyozni tudja a CS-PG-ok gátló hatását [175]. Ennek tulajdonítható, hogy a perifériás idegben a növekvő regenerálódó rostok el tudják érni a TZ területét. Valószínűleg ezzel magyarázható az a változás is, hogy a perifériás idegben megnőtt a HA expressziója a nervus vestibulocochlearisban az átvágástól distalisan.

Egyes kísérletekben különböző módokon, így human fetalis neuroblastok vagy OEC sejtek beültetésével próbálták serkenteni az axon benövést a TZ-n keresztül [205], más esetekben pedig CS-PG-k eltávolításával tették permisszívvé a TZ-t. A fenti eredmények emlősökön végzett kísérletekből születtek, alacsonyabb rendű élőlényekben az axonbenövést és következményes regenerációt nemcsak a vestibulocochlearis idegnél írták le, hanem a gerincvelőnél is. Békákon végzett kísérletek során a gerincvelői hátsó gyökér zúzását illetve transzszekcióját majd repozícióját követően a dorsalis ganglionok centrális axonjai képesek voltak átnőni a TZ-n [4], azonban ez a regeneráció nem volt tökéletes. Az eltérő regenerációs készség egyik oka feltehetően a TZ ECM összetételének különbözősége is lehet.

7.7 Az extracelluláris mátrix receptorai

Az extracelluláris mátrix receptorai közül jelen munkában csak a dystrophin-glycoprotein komplexet vizsgáltuk a béka központi idegrendszerében. Néhány szóban kitérnék az integrin receptorok jelentőségére is, mivel több tanulmányban kiemelték e receptorcsalád szerepét a regeneráció során.

7.7.1. A dystrophin-glycoprotein komplex (DGC) a béka idegrendszerében

Béka idegrendszerében elsőként mutattuk ki a dystrophin-glycoprotein komplex molekulái közül a **dystrophin** és a **β -dystroglycan** eloszlását. A dystrophin-IR pozitív volt a belépési zónában illetve a tractus vestibulocerebellaris és spinocerebellaris területén, míg a perifériás idegben nem tudtuk kimutatni. Kísérleteink során ugyan nem végeztünk glia kimutatására specifikus reakciót, de egerekben végzett vizsgálatok alapján valószínűnek tartjuk, hogy a fehérállományban lévő dystrophin gliához asszociált [134,147]. A NVL-ban a perikaryonok voltak pozitívak, ami utalhat arra is, hogy ezek a sejtek felszínükön expresszálják a dystrophint.

A DGC másik általunk vizsgált alkotóeleme a β -dystroglycan volt, mely molekula a perifériás idegekben intenzív reakciót mutatott. A központi idegrendszer más területein a patkányokban észleltékhez hasonlóan a β -dystroglycan ko-lokalizációt mutatott a dystrophinnal, ilyen volt a vestibularis magok területe [206]. A kisagyban csak a β -dystroglycan jelenlétét tudtuk kimutatni, elsősorban Purkinje sejtekben, korábbi irodalmi adatok alapján patkányban és egérben is kisagyban mutattak ki a DGC alkotásában résztvevő más molekulákat, így az α -dystroglycant és a dystrophint is [207]. Az erek és kapillárisok lamina basalis is β -dystroglycan pozitív volt, ahol a perivascularis gliatopak találhatóak. A gliatopakban a DGC más elemei is kimutathatóak, pl. az utrophin [208]. A gerincvelőben nemcsak a fehérállományban, hanem egyes neuronok idegsejtjeiben is ki tudtuk mutatni a β -dystroglycan jelenlétét. Emlősök agykérgében, hippocampusában illetve az agytörzsében elhelyezkedő neuronokban találtak β -dystroglycan-t [135,206].

A DGC az idegrendszerben található sejtek és az ECM közötti kapcsolat kialakításában is fontos szerepet játszik, azonban e kapcsolat szabályozásában több, az idegrendszeri sejtjei által termelt enzim és egyéb molekula is részt vesz. Ilyenek a matrix metalloproteinázok (MMP-k), vagy a laminin is, melyek közvetve vagy közvetlenül befolyásolják a DGC funkcióját. A MMP-k

cink-dependens endopeptidázok [209], amelyeknek fő target molekulái az ECM alkotóelemei. Az MMP-k szerepe fontos az embrionális fejlődésben és a szöveti morfogenezisben. E folyamatok során az MMP-k degradálják az ECM-et, így fokozzák a sejtmigrációt, megváltoztatják a sejtek viselkedését, illetve egyes biológiailag fontos, de aktuálisan gátolt molekulát felszabadítanak a gátlás alól. Idegrendszeri sérülést követően fokozódik az MMP-k aktivitása microglia sejtekben és astrocytákban [210]. Patkány agyban azokon a területeken találhatóak MMP-k ahol intenzív a szinaptogenezis [211]. Egyre több adat van arra vonatkozóan, hogy a DGC milyen mechanizmussal befolyásolja a szinaptikus aktivitást. A DGC alkotóelemei közül a dystrophin és a β -dystroglycan is kimutathatóak a szinapszisokhoz asszociáltnak. A poszt-szinaptikusan elhelyezkedő dystroglycanhoz kapcsolódnak a preszinaptikus helyzetű neurexinek, melyek így indirekten kapcsolódnak a dystrophinhez és befolyásolni tudják a poszt-szinaptikus cytoskeleton és egyéb proteineket. A szinaptikus résbe ürülő neurotransmitterek aktiválják a MMP-kat, amelyek hasítják a dystroglycan-neurexin kapcsolatot. Ennek következtében olyan konformáció átalakulások jöhetnek létre melyek pre- és poszt-szinaptikus változásokhoz vezethetnek. Ez a jelenség fontos szerepet játszik a neuronális plaszticitásban, a tanulásban, memóriában és LTP-kben [212]. Az MMP-k aktiválódása többek között laminin hatására is történhet. Kísérleteinkben a vestibularis léziót követően a laminin megjelenése a központi idegrendszerben azt is jelentheti, hogy ennek következtében aktiválódnak az MMP-k, ami elősegítheti a regenerációt és a szinaptogenezist. A laminin megjelenésével együtt előzetes vizsgálataink alapján megnőtt a dystroglycan expressziója is a vestibularis axotomiát követően. Ez a lelet arra utal, hogy a DGC és a laminin kölcsönhatása kulcsfontosságú lehet a regenerációs folyamatokban. Emlősökben kimutatták, hogy az alfa-dystroglycan képes elősegíteni a laminin polimerizációját a sejt felszínen, amelynek következtében a sejtben belül aktin reorganizációja és tirozin-kináz aktiválódása következik be [213]. Kimutatták azt is, hogy a laminin fokozza a dystroglycan clusterizációját illetve a dystroglycan képes kihorgonyozni a membrán egy meghatározott pontjához az acetilkolin receptorokat [214].

Elképzeltető, hogy a DGC ligandjai közül több, pl. az ECM makromolekulái is, befolyásolni tudják a fentiekben vázolt útvonalon keresztül a szinapszisok működését. Erre jó példát szolgáltatnak a központi idegrendszerben található GABAerg szinapszisokon végzett vizsgálatok. A DPC feltételezett szerepe a GABAerg szinapszisokban az lehet, hogy fokozza a GABA_AR stabilitását ezáltal úgy mond „befagyasztja” a GABAerg szinapszisokat, mivel a dystrophin szintje fokozatosan emelkedik a fejlődés során [140]. A DGC másik, merőben eltérő

feltételezett funkciója pedig az lehet, hogy modulálja a posztszinaptikus választ, illetve a DPC szabályozhatja a GABA felszabadulást is ezáltal szabályozhatja a GABA szinapszisok plaszticitását. Ez utóbbi eset valószínűsíthető békák vestibularis rendszerében is, mivel normál állapotban és regeneráció során is olyan helyeken jelent meg a DGC, ahol fokozott szinaptikus plaszticitás figyelhető meg. A dystrophin (dys2) immunreakció meglehetősen erős a NVL-ban a perikaryonok körül ép állatokban, míg a NVM-ban az IR intenzitása alacsonyabb. Vestibuláris léziót követően azonban az operált oldalon mind a két magban csökken az IR intenzitása, míg a nem operált oldalon a NVL-ban és a NVM-ban emelkedés figyelhető meg. Ezt a változást magyarázhatjuk azzal, hogy NVL-ban található GABAerg szinapszisok aktivitása a vestibularis léziót követően megváltozik, amely a DGC expressziójában is változásokat okozhat.

7.7.2. Integrin receptorok

Irodalmi adatokból ismert, hogy a glycoproteinek regenerációban betöltött szerepüket integrin receptorokon keresztül fejtik ki. Korábbi vizsgálatokban kimutatták, hogy az egyes idegsejt típusok eltérő integrin receptorokat expresszálnak a fejlődés különböző szakaszaiban illetve kifejlett állapotban [205]. Különbség figyelhető meg a perifériás és központi idegrendszerben is az integrin receptor eloszlásban és affinitásban. Míg a perifériás ideg sérülésekor az $\alpha 7\beta 1$ receptor expressziója megemelkedik, addig ugyanennek a receptornak az expressziója központi idegrendszer sérülésekor nem emelkedik [215]. Az embrionális perifériás idegrendszer ellensúlyozni tudja a CS-PG gátló hatását azzal, hogy több növekedést serkentő matrix molekulát (pl. laminin-1-et) expresszál [216]. A kifejlett emlősök központi idegrendszerben sérüléskor nem figyelhető meg integrin receptor upreguláció, szemben a perifériás idegrendszerrel, mert azt a CS-PG-ok megakadályozzák. Az integrin receptorok expressziójának modulálásával elérhető lehet az is, hogy a központi idegrendszeri neuronokat regenerációra serkentsük.

7.8. Az extracelluláris mátrix makromolekulák szerepe a szinaptikus plaszticitásban és remodellingben

Az ECM makromolekulák az idegrendszer fejlődése során is fontos szabályozó szerepet töltenek be a **szinaptikus plaszticitás** kialakulásában. A fejlődés kezdeti szakaszában ugyanis nagy számban találhatóak szinaptikus kapcsolatok az idegsejtek között, majd egyes szinapszisok

eltűnnek, míg mások stabilizálódnak és érett szinapszissá alakulnak. Ez utóbbi szinapszisok sokkal stabilabbak, azonban kevésbé plasztikusak. Azt a folyamatot, amely révén az érett szinapszisok létrejönnek a neuronális plaszticitás kritikus periódusának nevezzük [217]. Valószínűleg ebben a folyamatban kulcs szerepet játszanak az embrionális ECM makromolekulái is, mivel több folyadékot tudnak kötni, így nagyobb térfogatot töltenek ki [71]. Az extracelluláris térfogat szabályozásában a HA és a chondroitin-szulfátok játszanak fontos szerepet, a lektinok pedig szabályozni tudják a szabad HA mennyiségét, azáltal, hogy megkötik azt, így csökkentve folyadék kötő képességét.

A postembrionalis életben az idegrendszer normális működése során aktivitás-függő változások következnek be a szinaptikus jelátvitel hatékonyságában. Ilyen pl. az LTP (long-term potentiation) a hippocampusban, amely a memória és a tanulás molekuláris mechanizmusa [218]. Az LTP korai fázisában új fehérjék termelődnek a szinapszisokban [219]. Ilyen pl. a pleiotrophin, amely az inter- és periszinaptikus CS-PG-okkal és a neurocannal való kapcsolódáson keresztül befolyásolja a hippocampusban megjelenő LTP-ket.

A **remodelling** során (először a hippocampusban írták le) olyan ECM molekulák (pl.: tenascin C, neurocan, hyaluronsav) **re-expresszálódnak**, amelyek csak a fejlődő idegrendszerben fordulnak elő, és az érett idegrendszerben expressziójuk lecsökkent vagy hiányzik [176]. A PN destrukciójával, vagy a benne lévő molekulák down-regulációjával párhuzamosan juvenilis matrix komponensek up-regulálódhatnak. A remodelling során az **ECM proteázok** szerepét is kiemeli az irodalom. A MMP-knek fontos szerepük van az ECM remodellingben [220]. Az LTP-ben fontos szerepet játszanak még más proteázok, így a szerin-típusú proteolitikus-rendszer, a plasminogén aktiválta plasmin rendszer és a neuropsin, melyeknek szubsztrátjai a laminin és a fibronectin [221]. Emellett a PN szerkezetének fenntartásában fontos szerepe van a hyaluronidázoknak is, ezeknek az aktiválódása jelentős tényező lehet a szinaptikus plaszticitásban [222]. Valószínűleg a felsorolt enzimek is felelősek azért, hogy a PN eltűnjön a regenerálódó rostokat fogadó neuronok környezetéből.

A HA-kötő molekulák (brain link protein-1 és -2, CD44, LYVE-1, RHAMM, Toll-like receptor 4) versengése a PG-okkal a HA-on található kötőhelyekért megváltoztatja az ECM biofizikai tulajdonságait [223]. A HA-kötő molekulák a cytoszkelettonnal vannak kapcsolatban, és befolyásolják a különböző jelátviteli mechanizmusokat, és megjelenésük az ECM-ben ugyancsak befolyásolhatja a regenerációt.

7.9. Konklúzió

Összefoglalva elmondható, hogy az alacsonyabb rendű gerincesekben a központi idegrendszeri regeneráció valószínűleg azért lehetséges, mert a gátló molekulák a regeneráció idejére enzimatisz folyamatok révén eliminálódnak, mely folyamat az emlősökben limitált. A gátló faktorok lebontása az emlősök idegrendszerében is bekövetkezik, azonban kevésbé hatékonyan és sokkal lassabban, (macrophagok útján). A regeneráció elmaradásának másik oka az lehet, hogy a myelinből keletkező törmelék is sokkal tovább van jelen emlősökben [224].

Valószínűleg egyik ECM makromolekuláról sem mondható el, hogy minden esetben serkentő vagy gátló hatást fejt ki az axonnövekedésre, hanem hatásuk attól függ, hogy azon a sejten, amelyre hatnak milyen receptorok és extracelluláris mátrix ligandok találhatóak meg. Emellett a mikrokörnyezet is fontos befolyásoló tényező, mivel szimultán és sokszoros molekuláris hatás éri a sejteket, amelyet nehéz *in vitro* környezetben vizsgálni. E molekulák regenerációban betöltött szerepére főleg *in vitro* vizsgálatokból lehet következtetni, azonban az egyes molekulák kölcsönhatása teljesen megváltoztathatja szerepüket, ezért az *in vivo* modellek alkalmasabbnak látszanak a regenerációs vizsgálatokra [225].

8. ÖSSZEFOGLALÁS, AZ EREDMÉNYEK JELENTŐSÉGE

Jelen munka első részében a vestibularis rendszer kapcsolatait vizsgáltuk fény- és elektronmikroszkópos neuronális jelölési módszerekkel patkányban. Neurobiotin jelöléssel feltérképeztük a nucleus vestibularis descendens (NVD) antero- és retrográd kapcsolatait a központi idegrendszer struktúráival, megerősítve és kiegészítve a korábbi adatokat. Elsőként mutattuk ki a NVD kapcsolatát a nucleus ruberrel. A rhombencephalonban leírtuk a NVD kapcsolatait az azonos- és az ellenoldali vestibularis magokkal, az érző agytörzsi magokkal és a formatio reticularissal. A gerincvelő mindhárom funiculusaiban kimutattuk a leszálló rostokat. Leírtuk a mag korábban nem ismert retrográd kapcsolatait. Phaseolus vulgaris leucoagglutinin jelölés segítségével vizsgáltuk a nucleus vestibularis superior (NVS) szinaptikus kapcsolatait az oculomotorius maggal és a nucleus ruberrel. Az oculomotorius magban talált NVS eredetű, GABA pozitív terminálisok jelenléte alátámasztja a korábbi fiziológiai vizsgálatokban kimutatott gátló kapcsolatok jelenlétét. A nucleus ruber neuronjaival létesített hasonló kapcsolat azt jelenti, hogy a NVS a nucleus ruber neuronjainak gátlásával módosítja a cortico-rubralis és cerebello-rubralis útvonalak aktivitását.

A munka második részében az extracellularis matrix (ECM) makromolekuláinak és egyik receptorának megoszlását tanulmányoztuk béka idegrendszerében és vizsgáltuk szerepüket a vestibularis regenerációban. Specifikus próba segítségével a hyaluronsavat (HA), immunhisztokémiai módszerrel a phosphacant, valamint az ECM receptoraként ismert dystrophin-glycoprotein komplex alkotói közül a dystrophint és a β -dystroglycant elsőként mutattuk ki a béka idegrendszerében és leírtuk a tenascin, a fibronectin és a laminin eloszlását. A nervus vestibularis regenerációja során a HA mintázat kvalitatív és kvantitatív változásait ismertettük. Eredményeink szerint a perifériás idegrendszerben a HA permisszív hatású, amit a HA reakció intenzitásának növekedése jelez a regenerálódó idegben, valamint a perifériás és a központi idegrendszer átmeneténél lévő tranzicionális zónában (TZ). Ezzel szemben a központi idegrendszerben a HA non-permisszív hatása valószínű, amire a vestibularis magokban, az idegsejtek körüli un. perineuronal net (PN) területén a HA reakció intenzitásának csökkenése utal a regeneráció kezdetén, a benövő rostok kapcsolatainak kialakulását elősegítendő. A laminin immunreakció intenzitásának növekedése a vestibularis regeneráció során a perifériás idegrendszerben illetve a TZ-ban, és megjelenése a központi idegrendszerben a korábbi vizsgálatokban kimutatott permisszív szerepét igazolja az idegi regenerációban.

9. SUMMARY

In the first part of our work we investigated the connections of the vestibular system in the rat at light and electron microscopic levels with different tracing methods. Using neurobiotin, we mapped the antero- and retrograde connections of the descending vestibular nucleus (DVN) in the central nervous system (CNS), confirming and supplementing previous results. We have for the first time demonstrated a connection between the DVN and the red nucleus. At the level of the rhombencephalon we described the connections of the DVN with the ipsi- and contralateral vestibular nuclei, the sensory nuclei of the brainstem and the reticular formation. The descending axons of the DVN could be found in every funiculus of the spinal cord. We also demonstrated the previously unknown retrograde connections of the DVN with the rhombencephalic areas. Using the tracer, Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L), we investigated the synaptic connections of the superior vestibular nucleus (SVN) with the oculomotor and red nuclei. In the oculomotor nucleus, GABA positive axon terminals originating from the SVN support the presence of inhibitory connections described earlier in physiological experiments. Similar connections to the red nucleus suggest that neurons of the SVN can alter the activity of the cortico-rubral and cerebello-rubral pathways.

In the second part of our work we studied the distribution and role of the extracellular matrix (ECM) macromolecules in vestibular regeneration following vestibular nerve axotomy in the frog. We also analyzed the expression of ECM-receptor dystrophin-glycoprotein complex (DGC) subunits. We described for the first time in the nervous system of the frog the expression of hyaluronan (HA), using a specific binding-probe, and the distribution of phosphacan and DGC subunit dystrophin and beta-dystroglycan, using immunohistochemical methods. We gave a detailed map of the distribution of tenascin, fibronectin and laminin in the spinal cord and brainstem of the frog. We delineated the qualitative and quantitative changes in the expression of HA during vestibular regeneration. According to our results HA has a permissive role in the peripheral nervous system (PNS) and in the transitional zone (TZ) at the border between PNS and CNS during regeneration. The decreased expression of HA in the perineuronal net (PN) surrounding the vestibular neurons in the brainstem in the early phase of vestibular regeneration suggest that HA has a non-permissive role in the CNS, since the change in the distribution of HA can support the formation of new synaptic connections. We also showed an increased expression of laminin in the PNS, TZ and certain areas of the CNS during vestibular regeneration, indicating a permissive role of laminin as previously described.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kísérleteket a Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetében végeztem. Köszönettel tartozom mindazoknak, akik munkámhoz szakmai irányításukkal vagy közvetlen segítségükkel hozzájárultak.

Elsősorban köszönettel tartozom tudományos témavezetőmnek, Dr. Matesz Klára egyetemi tanárnak, aki magas szintű elméleti tudásával és tanácsaival munkámat messzemenőig segítette.

Köszönöm az Anatómiai Intézet jelenlegi és volt igazgatójának, Dr. Antal Miklós egyetemi tanárnak és Dr. Székely György akadémikusnak, hogy a munkámat lehetővé tették az intézetben, és tanácsaikkal kutatásaimat irányították.

Köszönöm mindazoknak a munkáját, akik a kísérletek technikai kivitelezésében voltak segítségemre, elsősorban Szanitter Bélánénak, aki nagyon sokat segített a laboratóriumi munkámba. Köszönettel tartozom munkatársaimnak, Dr. Bácskai Tímeának és Király Zoltánnak a kitartó segítségükért. A Szent István Egyetem Állatorvostudományi Karán végzett kísérleteimhez sok segítséget nyújtott Dr. Jancsik Veronika egyetemi magántanár, segítségét külön köszönöm. Eredményeink statisztikai elemzéséért külön köszönet illeti Dr. Wolf Ervint. Az elektronmikroszkópos felvételekhez nyújtott segítségüket köszönöm Dr. Laczkó Jenőnének valamint Miklósné Durkó Ágnesnek. A konfokális mikroszkópos felvételekben nyújtott segítséget köszönöm Dr. Veress Gábornak. Külön köszönet illeti Dr. Deményi Tamást a fotóanyagban és a nyomdatechnikai munkálatokban nyújtott segítségéért.

Köszönöm szüleimnek, hogy támogatták tanulmányaimat és bíztak bennem. Valamint köszönöm családom többi tagjának is a türelmüket.

11. IRODALOMJEGYZÉK

1. Balaban CD, Beryozkin G: **Vestibular nucleus projections to nucleus tractus solitarius and the dorsal motor nucleus of the vagus nerve: potential substrates for vestibulo-autonomic interactions.** *Exp Brain Res* 1994, **98**:200-212.
2. Halasi G, Bacskai T, Matesz C: **Connections of the superior vestibular nucleus with the oculomotor and red nuclei in the rat: An electron microscopic study.** *Brain Res Bull* 2005, **66**:532-535. Epub 2005 Mar 2004.
3. McKelvey-Briggs DK, Saint-Cyr JA, Spence SJ, Partlow GD: **A reinvestigation of the spinovestibular projection in the cat using axonal transport techniques.** *Anat Embryol* 1989, **180**:281-291.
4. Liuzzi FJ, Lasek RJ: **Regeneration of lumbar dorsal root axons into the spinal cord of adult frogs (*Rana pipiens*), an HRP study.** *J Comp Neurol* 1985, **232**:456-465.
5. Newman A, Kuruvilla A, Pereda A, Honrubia V: **Regeneration of the eighth cranial nerve. I. Anatomic verification in the bullfrog.** *Laryngoscope* 1986, **96**:484-493.
6. Brodal A, Pompeiano M, Walberg F: *The Vestibular Nuclei and Their Connections, Anatomy and Functional Correlations.* Edited by Boyd O. Edinburgh, London; 1962.
7. Graf W, Spencer R, Baker H, Baker R: **Vestibuloocular reflex of the adult flatfish. III. A species-specific reciprocal pattern of excitation and inhibition.** *J Neurophysiol* 2001, **86**:1376-1388.
8. Matesz C: **Central projection of the VIIIth cranial nerve in the frog.** *Neuroscience* 1979, **4**:2061-2071.
9. Szentagothai J, Rethelyi M: *Funkcionális anatómia*, vol 3 edn 4. átdolgozott kiadás. Budapest: Medicina Könyvkiadó; 1985.
10. Gacek RR: **Anatomical demonstration of the vestibulo-ocular projections in the cat.** *Acta Otolaryngol Suppl* 1971, **293**:1-63.
11. Mitsacos A, Reisine H, Highstein SM: **The superior vestibular nucleus: an intracellular HRP study in the cat. II. Non-vestibulo-ocular neurons.** *J Comp Neurol* 1983, **215**:92-107.
12. McCrea RA, Strassman A, Highstein SM: **Anatomical and physiological characteristics of vestibular neurons mediating the vertical vestibulo-ocular reflexes of the squirrel monkey.** *J Comp Neurol* 1987, **264**:571-594.
13. Highstein SM: **Synaptic linkage in the vestibulo-ocular and cerebello-vestibular pathways to the VIth nucleus in the rabbit.** *Exp Brain Res* 1973, **17**:301-314.
14. Graf W, Baker R: **Adaptive changes of the vestibulo-ocular reflex in flatfish are achieved by reorganization of central nervous pathways.** *Science* 1983, **221**:777-779.
15. Wentzel PR, De Zeeuw CI, Holstege JC, Gerrits NM: **Colocalization of GABA and glycine in the rabbit oculomotor nucleus.** *Neurosci Lett* 1993, **164**:25-29.
16. Walberg F, Ottersen OP, Rinvik E: **GABA, glycine, aspartate, glutamate and taurine in the vestibular nuclei: an immunocytochemical investigation in the cat.** *Exp Brain Res* 1990, **79**:547-563.
17. Matesz C, Kulik A, Bacskai T: **Ascending and descending projections of the lateral vestibular nucleus in the frog *Rana esculenta*.** *J Comp Neurol* 2002, **444**:115-128.
18. Sans A, Raymond J, Marty R: **A vestibulothalamic pathway: electrophysiological demonstration in the cat by localized cooling.** *J Neurosci Res* 1976, **2**:167-174.

19. Matesz C, Nagy E, Kulik A, Tonkol A: **Projections of the medial and superior vestibular nuclei to the brainstem and spinal cord in the rat.** *Neurobiology* 1997, **5**:489-493.
20. Shiroyama T, Kayahara T, Yasui Y, Nomura J, Nakano K: **Projections of the vestibular nuclei to the thalamus in the rat: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study.** *J Comp Neurol* 1999, **407**:318-332.
21. Matesz C, Bacskai T, Nagy E, Halasi G, Kulik A: **Efferent connections of the vestibular nuclei in the rat: a neuromorphological study using PHA-L.** *Brain Res Bull* 2002, **57**:313-315.
22. Brodal A: **The vestibular nuclei in the macaque monkey.** *J Comp Neurol* 1984, **227**:252-266.
23. Peterson BW, Coulter JD: **A new long spinal projection from the vestibular nuclei in the cat.** *Brain Res* 1977, **122**:351-356.
24. Brodal P, Brodal A: **The olivocerebellar projection in the monkey. Experimental studies with the method of retrograde tracing of horseradish peroxidase.** *J Comp Neurol* 1981, **201**:375-393.
25. Nyberg-Hansen R: **Functional organization of descending supraspinal fibre systems to the spinalcord. Anatomical observations and physiological correlations.** *Ergeb Anat Entwicklungsgesch* 1966, **39**:3-48.
26. Donevan AH, Fleming FL, Rose PK: **Morphology of single vestibulospinal collaterals in the upper cervical spinal cord of the cat: I. Collaterals originating from axons in the ventromedial funiculus contralateral to their cells of origin.** *J Comp Neurol* 1992, **322**:325-342.
27. Yates BJ, Balaban CD, Miller AD, Endo K, Yamaguchi Y: **Vestibular inputs to the lateral tegmental field of the cat: potential role in autonomic control.** *Brain Res* 1995, **689**:197-206.
28. Wilson VJ, Melvill Jones G: *Mammalian vestibular physiology*. New York: Plenum Press; 1979.
29. Ladpli R, Brodal A: **Experimental studies of commissural and reticular formation projections from the vestibular nuclei in the cat.** *Brain Res* 1968, **8**:65-96.
30. Grofova I, Corvaja N: **Commissural projection from the nuclei of termination of the 8th cranial nerve in the toad.** *Brain Res* 1972, **42**:189-195.
31. Dieringer N, Precht W: **Synaptic mechanisms involved in compensation of vestibular function following hemilabyrinthectomy.** *Prog Brain Res* 1979, **50**:607-615.
32. Vidal PP, de Waele C, Vibert N, Muhlethaler M: **Vestibular compensation revisited.** *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998, **119**:34-42.
33. Dieringer N: **'Vestibular compensation': neural plasticity and its relations to functional recovery after labyrinthine lesions in frogs and other vertebrates.** *Prog Neurobiol* 1995, **46**:97-129.
34. Ito J, Matsuoka I, Sasa M, Takaori S: **Commissural and ipsilateral internuclear connection of vestibular nuclear complex of the cat.** *Brain Res* 1985, **341**:73-81.
35. Epema AH, Gerrits NM, Voogd J: **Commissural and intrinsic connections of the vestibular nuclei in the rabbit: a retrograde labeling study.** *Exp Brain Res* 1988, **71**:129-146.
36. Sanes JR: **Extracellular matrix molecules that influence neural development.** *Annu Rev Neurosci* 1989, **12**:491-516.
37. Jessell TM: **Adhesion molecules and the hierarchy of neural development.** *Neuron* 1988, **1**:3-13.

38. Margolis RU, Margolis RK, Chang LB, Preti C: **Glycosaminoglycans of brain during development.** *Biochemistry* 1975, **14**:85-88.
39. Delpech B, Halavet C: **Characterization and purification from human brain of a hyaluronic acid-binding glycoprotein, hyaluronectin.** *J Neurochem* 1981, **36**:855-859.
40. Yasuhara O, Akiyama H, McGeer EG, McGeer PL: **Immunohistochemical localization of hyaluronic acid in rat and human brain.** *Brain Res* 1994, **635**:269-282.
41. Meiners S, Geller HM: **Long and short splice variants of human tenascin differentially regulate neurite outgrowth.** *Mol Cell Neurosci* 1997, **10**:100-116.
42. Margolis RU, Margolis RK: **Aggrecan-versican-neurocan family proteoglycans.** *Methods Enzymol* 1994, **245**:105-126.
43. Rhodes KE, Fawcett JW: **Chondroitin sulphate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS?** *J Anat* 2004, **204**:33-48.
44. Tammi R, Ripellino JA, Margolis RU, Maibach HI, Tammi M: **Hyaluronate accumulation in human epidermis treated with retinoic acid in skin organ culture.** *J Invest Dermatol* 1989, **92**:326-332.
45. Hartmann U, Maurer P: **Proteoglycans in the nervous system--the quest for functional roles in vivo.** *Matrix Biol* 2001, **20**:23-35.
46. Rauch U, Karthikeyan L, Maurel P, Margolis RU, Margolis RK: **Cloning and primary structure of neurocan, a developmentally regulated, aggregating chondroitin sulfate proteoglycan of brain.** *J Biol Chem* 1992, **267**:19536-19547.
47. Yamada H, Watanabe K, Shimonaka M, Yamaguchi Y: **Molecular cloning of brevican, a novel brain proteoglycan of the aggrecan/versican family.** *J Biol Chem* 1994, **269**:10119-10126.
48. Hardingham TE, Muir H: **Binding of oligosaccharides of hyaluronic acid to proteoglycans.** *Biochem J* 1973, **135**:905-908.
49. Tammi R, Ronkko S, Agren UM, Tammi M: **Distribution of hyaluronan in bull reproductive organs.** *J Histochem Cytochem* 1994, **42**:1479-1486.
50. Heinegard D, Wieslander J, Sheehan J, Paulsson M, Sommarin Y: **Separation and characterization of two populations of aggregating proteoglycans from cartilage.** *Biochem J* 1985, **225**:95-106.
51. Krusius T, Gehlsen KR, Ruoslahti E: **A fibroblast chondroitin sulfate proteoglycan core protein contains lectin-like and growth factor-like sequences.** *J Biol Chem* 1987, **262**:13120-13125.
52. Lebaron RG: **Versican.** *Perspect Dev Neurobiol* 1996, **3**:261-271.
53. Bignami A, Hosley M, Dahl D: **Hyaluronic acid and hyaluronic acid-binding proteins in brain extracellular matrix.** *Anat Embryol (Berl)* 1993, **188**:419-433.
54. Jalkanen S, Jalkanen M: **Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin.** *J Cell Biol* 1992, **116**:817-825.
55. Perris R, Krotoski D, Lallier T, Domingo C, Sorrell JM, Bronner-Fraser M: **Spatial and temporal changes in the distribution of proteoglycans during avian neural crest development.** *Development* 1991, **111**:583-599.
56. Oakley RA, Tosney KW: **Peanut agglutinin and chondroitin-6-sulfate are molecular markers for tissues that act as barriers to axon advance in the avian embryo.** *Dev Biol* 1991, **147**:187-206.
57. Yamaguchi Y: **Brevican: a major proteoglycan in adult brain.** *Perspect Dev Neurobiol* 1996, **3**:307-317.

58. Zako M, Shinomura T, Ujita M, Ito K, Kimata K: **Expression of PG-M(V3), an alternatively spliced form of PG-M without a chondroitin sulfate attachment in region in mouse and human tissues.** *J Biol Chem* 1995, **270**:3914-3918.
59. Rauch U, Grimpe B, Kulbe G, Arnold-Ammer I, Beier DR, Fassler R: **Structure and chromosomal localization of the mouse neurocan gene.** *Genomics* 1995, **28**:405-410.
60. Oohira A, Matsui F, Watanabe E, Kushima Y, Maeda N: **Developmentally regulated expression of a brain specific species of chondroitin sulfate proteoglycan, neurocan, identified with a monoclonal antibody IG2 in the rat cerebrum.** *Neuroscience* 1994, **60**:145-157.
61. Friedlander DR, Milev P, Karthikeyan L, Margolis RK, Margolis RU, Grumet M: **The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth.** *J Cell Biol* 1994, **125**:669-680.
62. Milev P, Chiba A, Haring M, Rauvala H, Schachner M, Ranscht B, Margolis RK, Margolis RU: **High affinity binding and overlapping localization of neurocan and phosphacan/protein-tyrosine phosphatase-zeta/beta with tenascin-R, amphoterin, and the heparin-binding growth-associated molecule.** *J Biol Chem* 1998, **273**:6998-7005.
63. Brittis PA, Canning DR, Silver J: **Chondroitin sulfate as a regulator of neuronal patterning in the retina.** *Science* 1992, **255**:733-736.
64. Yamada H, Fredette B, Shitara K, Hagihara K, Miura R, Ranscht B, Stallcup WB, Yamaguchi Y: **The brain chondroitin sulfate proteoglycan brevican associates with astrocytes ensheathing cerebellar glomeruli and inhibits neurite outgrowth from granule neurons.** *J Neurosci* 1997, **17**:7784-7795.
65. Hagihara K, Miura R, Kosaki R, Berglund E, Ranscht B, Yamaguchi Y: **Immunohistochemical evidence for the brevican-tenascin-R interaction: colocalization in perineuronal nets suggests a physiological role for the interaction in the adult rat brain.** *J Comp Neurol* 1999, **410**:256-264.
66. Radotra B, McCormick D, Crockard A: **CD44 plays a role in adhesive interactions between glioma cells and extracellular matrix components.** *Neuropathol Appl Neurobiol* 1994, **20**:399-405.
67. Carney SL, Muir H: **The structure and function of cartilage proteoglycans.** *Physiol Rev* 1988, **68**:858-910.
68. Doege KJ, Sasaki M, Kimura T, Yamada Y: **Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. Human-specific repeats, and additional alternatively spliced forms.** *J Biol Chem* 1991, **266**:894-902.
69. Hennig A, Krueger R, Mangoura D, Schwartz NB: **Chondroitin sulfate proteoglycan expression during neuronal development.** *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1992, **38**:585-593.
70. Faissner A: **The tenascin gene family in axon growth and guidance.** *Cell Tissue Res* 1997, **290**:331-341.
71. Hockfield S, Kalb RG, Zaremba S, Fryer H: **Expression of neural proteoglycans correlates with the acquisition of mature neuronal properties in the mammalian brain.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1990, **55**:505-514.

72. Lander C, Kind P, Maleski M, Hockfield S: **A family of activity-dependent neuronal cell-surface chondroitin sulfate proteoglycans in cat visual cortex.** *J Neurosci* 1997, **17**:1928-1939.
73. Margolis RK, Rauch U, Maurel P, Margolis RU: **Neurocan and phosphacan: two major nervous tissue-specific chondroitin sulfate proteoglycans.** *Perspect Dev Neurobiol* 1996, **3**:273-290.
74. Levy JB, Canoll PD, Silvennoinen O, Barnea G, Morse B, Honegger AM, Huang JT, Cannizzaro LA, Park SH, Druck T, et al.: **The cloning of a receptor-type protein tyrosine phosphatase expressed in the central nervous system.** *J Biol Chem* 1993, **268**:10573-10581.
75. Meyer-Puttlitz B, Junker E, Margolis RU, Margolis RK: **Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing central nervous system. II. Immunocytochemical localization of neurocan and phosphacan.** *J Comp Neurol* 1996, **366**:44-54.
76. Sakurai T, Lustig M, Nativ M, Hemperly JJ, Schlessinger J, Peles E, Grumet M: **Induction of neurite outgrowth through contactin and Nr-CAM by extracellular regions of glial receptor tyrosine phosphatase beta.** *J Cell Biol* 1997, **136**:907-918.
77. Faissner A, Clement A, Lochter A, Streit A, Mandl C, Schachner M: **Isolation of a neural chondroitin sulfate proteoglycan with neurite outgrowth promoting properties.** *J Cell Biol* 1994, **126**:783-799.
78. Scott JE, Heatley F: **Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: a ¹³C NMR study.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:4850-4855.
79. Laurent TC, Fraser JR: **Hyaluronan.** *Faseb J* 1992, **6**:2397-2404.
80. Meszar Z, Matesz C, Szigeti ZM, Veress G, Szekely G, Felszeghy S, Modis L: **Distribution of hyaluronan and associated proteins in the spinal cord of chicken embryos.** *FEBS Journal* 2005:272-273.
81. Asher R, Bignami A: **Localization of hyaluronate in primary glial cell cultures derived from newborn rat brain.** *Exp Cell Res* 1991, **195**:401-411.
82. Weigel PH, Hascall VC, Tammi M: **Hyaluronan synthases.** *J Biol Chem* 1997, **272**:13997-14000.
83. Yoneda M, Yamagata M, Suzuki S, Kimata K: **Hyaluronic acid modulates proliferation of mouse dermal fibroblasts in culture.** *J Cell Sci* 1988, **90**:265-273.
84. Roden L, Campbell P, Fraser JR, Laurent TC, Pertoft H, Thompson JN: **Enzymic pathways of hyaluronan catabolism.** *Ciba Found Symp* 1989, **143**:60-76.
85. Yamagata M, Yamada KM, Yoneda M, Suzuki S, Kimata K: **Chondroitin sulfate proteoglycan (PG-M-like proteoglycan) is involved in the binding of hyaluronic acid to cellular fibronectin.** *J Biol Chem* 1986, **261**:13526-13535.
86. Underhill CB, Toole BP: **Receptors for hyaluronate on the surface of parent and virus-transformed cell lines: binding and aggregation studies.** *Exp Cell Res* 1981, **131**:419-423.
87. Laurent TC, Fraser JR, Pertoft H, Smedsrod B: **Binding of hyaluronate and chondroitin sulphate to liver endothelial cells.** *Biochem J* 1986, **234**:653-658.
88. Cheung WF, Cruz TF, Turley EA: **Receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM), a hyaladherin that regulates cell responses to growth factors.** *Biochem Soc Trans* 1999, **27**:135-142.
89. Fitzgerald KA, Bowie AG, Skeffington BS, O'Neill LA: **Ras, protein kinase C zeta, and I kappa B kinases 1 and 2 are downstream effectors of CD44 during the activation of**

- NF-kappa B by hyaluronic acid fragments in T-24 carcinoma cells.** *J Immunol* 2000, **164**:2053-2063.
90. Entwistle J, Hall CL, Turley EA: **HA receptors: regulators of signalling to the cytoskeleton.** *J Cell Biochem* 1996, **61**:569-577.
 91. Evanko SP, Angello JC, Wight TN: **Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999, **19**:1004-1013.
 92. Delpech B, Delpech A, Bruckner G, Girard N, Maingonnat C: **Hyaluronan and hyaluronectin in the nervous system.** *Ciba Found Symp* 1989, **143**:208-220.
 93. Ozgenel GY, Filiz G: **Effects of human amniotic fluid on peripheral nerve scarring and regeneration in rats.** *J Neurosurg* 2003, **98**:371-377.
 94. Hynes RO, Schwarzbauer JE, Tamkun JW: **Isolation and analysis of cDNA and genomic clones of fibronectin and its receptor.** *Methods Enzymol* 1987, **144**:447-463.
 95. Rogers SL, Letourneau PC, Peterson BA, Furcht LT, McCarthy JB: **Selective interaction of peripheral and central nervous system cells with two distinct cell-binding domains of fibronectin.** *J Cell Biol* 1987, **105**:1435-1442.
 96. Wayner EA, Carter WG: **Identification of multiple cell adhesion receptors for collagen and fibronectin in human fibrosarcoma cells possessing unique alpha and common beta subunits.** *J Cell Biol* 1987, **105**:1873-1884.
 97. Lander AD: **Molecules that make axons grow.** *Mol Neurobiol* 1987, **1**:213-245.
 98. Stewart GR, Pearlman AL: **Fibronectin-like immunoreactivity in the developing cerebral cortex.** *J Neurosci* 1987, **7**:3325-3333.
 99. Luckenbill-Edds L: **Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth.** *Brain Res Brain Res Rev* 1997, **23**:1-27.
 100. Colognato H, Yurchenco PD: **Form and function: the laminin family of heterotrimers.** *Dev Dyn* 2000, **218**:213-234.
 101. Graf J, Ogle RC, Robey FA, Sasaki M, Martin GR, Yamada Y, Kleinman HK: **A pentapeptide from the laminin B1 chain mediates cell adhesion and binds the 67,000 laminin receptor.** *Biochemistry* 1987, **26**:6896-6900.
 102. Clark P, Britland S, Connolly P: **Growth cone guidance and neuron morphology on micropatterned laminin surfaces.** *J Cell Sci* 1993, **105**:203-212.
 103. Indyk JA, Chen ZL, Tsirka SE, Strickland S: **Laminin chain expression suggests that laminin-10 is a major isoform in the mouse hippocampus and is degraded by the tissue plasminogen activator/plasmin protease cascade during excitotoxic injury.** *Neuroscience* 2003, **116**:359-371.
 104. Weber P, Montag D, Schachner M, Bernhardt RR: **Zebrafish tenascin-W, a new member of the tenascin family.** *J Neurobiol* 1998, **35**:1-16.
 105. Chiquet-Ehrismann R: **What distinguishes tenascin from fibronectin?** *Faseb J* 1990, **4**:2598-2604.
 106. Yokosaki Y, Matsuura N, Higashiyama S, Murakami I, Obara M, Yamakido M, Shigeto N, Chen J, Sheppard D: **Identification of the ligand binding site for the integrin alpha9 beta1 in the third fibronectin type III repeat of tenascin-C.** *J Biol Chem* 1998, **273**:11423-11428.
 107. Aspberg A, Binkert C, Ruoslahti E: **The versican C-type lectin domain recognizes the adhesion protein tenascin-R.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**:10590-10594.
 108. Celio MR, Blumcke I: **Perineuronal nets--a specialized form of extracellular matrix in the adult nervous system.** *Brain Res Brain Res Rev* 1994, **19**:128-145.

109. Bruckner G, Grosche J, Schmidt S, Hartig W, Margolis RU, Delpech B, Seidenbecher CI, Czaniera R, Schachner M: **Postnatal development of perineuronal nets in wild-type mice and in a mutant deficient in tenascin-R.** *J Comp Neurol* 2000, **428**:616-629.
110. Hockfield S, McKay RD: **A surface antigen expressed by a subset of neurons in the vertebrate central nervous system.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983, **80**:5758-5761.
111. Celio MR, Spreafico R, De Biasi S, Vitellaro-Zuccarello L: **Perineuronal nets: past and present.** *Trends Neurosci* 1998, **21**:510-515.
112. Celio MR: **Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system.** *Neuroscience* 1990, **35**:375-475.
113. Glegg RE, Pearce RH: **Chemical extraction of metachromatic and periodic acid-Schiff positive carbohydrates from cerebral tissue.** *J Comp Neurol* 1956, **106**:291-297.
114. Feigin I: **The mucopolysaccharides of the ground substance of the human brain.** *J Neuropathol Exp Neurol* 1980, **39**:1-12.
115. Fox K, Caterson B: **Neuroscience. Freeing the brain from the perineuronal net.** *Science* 2002, **298**:1187-1189.
116. Knudson CB, Knudson W: **Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease.** *Faseb J* 1993, **7**:1233-1241.
117. Bruckner G, Brauer K, Hartig W, Wolff JR, Rickmann MJ, Derouiche A, Delpech B, Girard N, Oertel WH, Reichenbach A: **Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain.** *Glia* 1993, **8**:183-200.
118. Wintergerst ES, Vogt Weisenhorn DM, Rathjen FG, Riederer BM, Lambert S, Celio MR: **Temporal and spatial appearance of the membrane cytoskeleton and perineuronal nets in the rat neocortex.** *Neurosci Lett* 1996, **209**:173-176.
119. Kaar GF, Fraher JP: **The sheaths surrounding the attachments of rat lumbar ventral roots to the spinal cord: a light and electron microscopical study.** *J Anat* 1986, **148**:137-146.
120. Golding JP, Cohen J: **Border controls at the mammalian spinal cord: late-surviving neural crest boundary cap cells at dorsal root entry sites may regulate sensory afferent ingrowth and entry zone morphogenesis.** *Mol Cell Neurosci* 1997, **9**:381-396.
121. O'Brien D, Dockery P, McDermott K, Fraher JP: **The ventral motoneurone axon bundle in the CNS--a cordone system?** *J Neurocytol* 1998, **27**:247-258.
122. Steinmetz MP, Horn KP, Tom VJ, Miller JH, Busch SA, Nair D, Silver DJ, Silver J: **Chronic enhancement of the intrinsic growth capacity of sensory neurons combined with the degradation of inhibitory proteoglycans allows functional regeneration of sensory axons through the dorsal root entry zone in the mammalian spinal cord.** *J Neurosci* 2005, **25**:8066-8076.
123. Popp S, Andersen JS, Maurel P, Margolis RU: **Localization of aggrecan and versican in the developing rat central nervous system.** *Dev Dyn* 2003, **227**:143-149.
124. Beggah AT, Dours-Zimmermann MT, Barras FM, Brosius A, Zimmermann DR, Zurn AD: **Lesion-induced differential expression and cell association of Neurocan, Brevican, Versican V1 and V2 in the mouse dorsal root entry zone.** *Neuroscience* 2005, **133**:749-762.
125. Ramer MS: **Spontaneous functional viscerosensory regeneration into the adult brainstem.** *J Neurosci* 2003, **23**:9770-9775.

126. Ibraghimov-Beskrovnya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP: **Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix.** *Nature* 1992, **355**:696-702.
127. Henry MD, Campbell KP: **Dystroglycan inside and out.** *Curr Opin Cell Biol* 1999, **11**:602-607.
128. Holt KH, Crosbie RH, Venzke DP, Campbell KP: **Biosynthesis of dystroglycan: processing of a precursor propeptide.** *FEBS Lett* 2000, **468**:79-83.
129. Henry MD, Campbell KP: **A role for dystroglycan in basement membrane assembly.** *Cell* 1998, **95**:859-870.
130. Montanaro F, Carbonetto S: **Targeting dystroglycan in the brain.** *Neuron* 2003, **37**:193-196.
131. Tokarz SA, Duncan NM, Rash SM, Sadeghi A, Dewan AK, Pillers DA: **Redefinition of dystrophin isoform distribution in mouse tissue by RT-PCR implies role in nonmuscle manifestations of duchenne muscular dystrophy.** *Mol Genet Metab* 1998, **65**:272-281.
132. Bar S, Barnea E, Levy Z, Neuman S, Yaffe D, Nudel U: **A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the known isoforms in its structure and tissue distribution.** *Biochem J* 1990, **272**:557-560.
133. Lederfein D, Levy Z, Augier N, Mornet D, Morris G, Fuchs O, Yaffe D, Nudel U: **A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscle tissues.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**:5346-5350.
134. Lidov HG: **Dystrophin in the nervous system.** *Brain Pathol* 1996, **6**:63-77.
135. Tian M, Jacobson C, Gee SH, Campbell KP, Carbonetto S, Jucker M: **Dystroglycan in the cerebellum is a laminin alpha 2-chain binding protein at the glial-vascular interface and is expressed in Purkinje cells.** *Eur J Neurosci* 1996, **8**:2739-2747.
136. Jung D, Yang B, Meyer J, Chamberlain JS, Campbell KP: **Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on beta-dystroglycan.** *J Biol Chem* 1995, **270**:27305-27310.
137. Zaccaria ML, De Stefano ME, Gotti C, Petrucci TC, Paggi P: **Selective reduction in the nicotinic acetylcholine receptor and dystroglycan at the postsynaptic apparatus of mdx mouse superior cervical ganglion.** *J Neuropathol Exp Neurol* 2000, **59**:103-112.
138. Cavaldesi M, Macchia G, Barca S, Defilippi P, Tarone G, Petrucci TC: **Association of the dystroglycan complex isolated from bovine brain synaptosomes with proteins involved in signal transduction.** *J Neurochem* 1999, **72**:1648-1655.
139. James M, Nuttall A, Ilsley JL, Ottersbach K, Tinsley JM, Sudol M, Winder SJ: **Adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of (beta)-dystroglycan regulates its interaction with utrophin.** *J Cell Sci* 2000, **113**:1717-1726.
140. Knuesel I, Mastrocola M, Zuellig RA, Bornhauser B, Schaub MC, Fritschy JM: **Short communication: altered synaptic clustering of GABAA receptors in mice lacking dystrophin (mdx mice).** *Eur J Neurosci* 1999, **11**:4457-4462.
141. Hemler ME: **VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes.** *Annu Rev Immunol* 1990, **8**:365-400.
142. Suzuki S, Naitoh Y: **Amino acid sequence of a novel integrin beta 4 subunit and primary expression of the mRNA in epithelial cells.** *Embo J* 1990, **9**:757-763.
143. Kim M, Carman CV, Yang W, Salas A, Springer TA: **The primacy of affinity over clustering in regulation of adhesiveness of the integrin {alpha}L{beta}2.** *J Cell Biol* 2004, **167**:1241-1253.

144. Paxinos G, Watson C: *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 4th Edition*. New York, Boston, London: Academic Press; 1998.
145. Gerfen CR, Sawchenko PE: **An anterograde neuroanatomical tracing method that shows the detailed morphology of neurons, their axons and terminals: immunohistochemical localization of an axonally transported plant lectin, Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L).** *Brain Res* 1984, **290**:219-238.
146. Matesz C, Modis L, Halasi G, Szigeti ZM, Felszeghy S, Bacskai T, Szekely G: **Extracellular matrix molecules and their possible roles in the regeneration of frog nervous system.** *Brain Res Bull* 2005, **66**:526-531.
147. Mehes E, Mornet D, Jancsik V: **Subcellular localization of components of the dystrophin glycoprotein complex in cultured retinal muller glial cells.** *Acta Biol Hung* 2003, **54**:241-252.
148. Felszeghy S, Hyttinen M, Tammi R, Tammi M, Modis L: **Quantitative image analysis of hyaluronan expression in human tooth germs.** *Eur J Oral Sci* 2000, **108**:320-326.
149. Deecke L, Schwarz DW, Fredrickson JM: **Vestibular responses in the rhesus monkey ventroposterior thalamus. II. Vestibulo-proprioceptive convergence at thalamic neurons.** *Exp Brain Res* 1977, **30**:219-232.
150. Smith PF: **Vestibular-hippocampal interactions.** *Hippocampus* 1997, **7**:465-471.
151. Horii A, Russell NA, Smith PF, Darlington CL, Bilkey DK: **Vestibular influences on CA1 neurons in the rat hippocampus: an electrophysiological study in vivo.** *Exp Brain Res* 2004, **155**:245-250. Epub 2003 Dec 2010.
152. Kim U, Gregory E, Hall WC: **Pathway from the zona incerta to the superior colliculus in the rat.** *J Comp Neurol* 1992, **321**:555-575.
153. Huffman RF, Henson OW, Jr.: **The descending auditory pathway and acousticomotor systems: connections with the inferior colliculus.** *Brain Res Brain Res Rev* 1990, **15**:295-323.
154. Ito M, Nisimaru N, Yamamoto M: **The neural pathways mediating reflex contraction of extraocular muscles during semicircular canal stimulation in rabbits.** *Brain Res* 1973, **55**:183-188.
155. Voogd J, Glickstein M: **The anatomy of the cerebellum.** *Trends Neurosci* 1998, **21**:370-375.
156. Cottingham SL, Pfaff DW: **Electrical stimulation of the midbrain central gray facilitates lateral vestibulospinal activation of back muscle EMG in the rat.** *Brain Res* 1987, **421**:397-400.
157. Cirelli C, Pompeiano M, D'Ascanio P, Arrighi P, Pompeiano O: **c-fos Expression in the rat brain after unilateral labyrinthectomy and its relation to the uncompensated and compensated stages.** *Neuroscience* 1996, **70**:515-546.
158. Calza L, Giardino L, Zanni M, Galetti G: **Muscarinic and gamma-aminobutyric acid-ergic receptor changes during vestibular compensation. A quantitative autoradiographic study of the vestibular nuclei complex in the rat.** *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1992, **249**:34-39.
159. de Waele C, Abitbol M, Chat M, Menini C, Mallet J, Vidal PP: **Distribution of glutamatergic receptors and GAD mRNA-containing neurons in the vestibular nuclei of normal and hemilabyrinthectomized rats.** *Eur J Neurosci* 1994, **6**:565-576.
160. Wilson VJ, Wylie RM, Marco LA: **Synaptic inputs to cells in the medial vestibular nucleus.** *J Neurophysiol* 1968, **31**:176-185.

161. Miller AD, Ruggiero DA: **Emetic reflex arc revealed by expression of the immediate-early gene c-fos in the cat.** *J Neurosci* 1994, **14**:871-888.
162. Buisseret-Delmas C, Compoin C, Delfini C, Buisseret P: **Organisation of reciprocal connections between trigeminal and vestibular nuclei in the rat.** *J Comp Neurol* 1999, **409**:153-168.
163. Nelson BJ, Adams JC, Barmack NH, Mugnaini E: **Comparative study of glutamate decarboxylase immunoreactive boutons in the mammalian inferior olive.** *J Comp Neurol* 1989, **286**:514-539.
164. Matsushita M, Gao X, Yaginuma H: **Spinovestibular projections in the rat, with particular reference to projections from the central cervical nucleus to the lateral vestibular nucleus.** *J Comp Neurol* 1995, **361**:334-334.
165. Cottingham SL, Femano PA, Pfaff DW: **Vestibulospinal and reticulospinal interactions in the activation of back muscle EMG in the rat.** *Exp Brain Res* 1988, **73**:198-208.
166. Spencer RF, Baker R: **GABA and glycine as inhibitory neurotransmitters in the vestibuloocular reflex.** *Ann N Y Acad Sci* 1992, **656**:602-611.
167. Furuya N, Koizumi T: **Neurotransmitters of vestibular commissural inhibition in the cat.** *Acta Otolaryngol* 1998, **118**:64-69.
168. Kulik A, Matesz K, Szekely G: **Mesencephalic projections of the cochlear nucleus in the frog, *Rana esculenta*.** *Acta Biol Hung* 1994, **45**:323-335.
169. Mays LE: **Neural control of vergence eye movements: convergence and divergence neurons in midbrain.** *J Neurophysiol* 1984, **51**:1091-1108.
170. Faraldi C, Falugi C, Fasulo S: **Glycoconjugate expression changes during *Rana dalmatina* early development.** *Eur J Histochem* 1996, **40**:67-74.
171. Canoll PD, Barnea G, Levy JB, Sap J, Ehrlich M, Silvennoinen O, Schlessinger J, Musacchio JM: **The expression of a novel receptor-type tyrosine phosphatase suggests a role in morphogenesis and plasticity of the nervous system.** *Brain Res Dev Brain Res* 1993, **75**:293-298.
172. Jones LL, Kreutzberg GW, Raivich G: **Regulation of CD44 in the regenerating mouse facial motor nucleus.** *Eur J Neurosci* 1997, **9**:1854-1863.
173. Lynn BD, Li X, Cattini PA, Turley EA, Nagy JI: **Identification of sequence, protein isoforms, and distribution of the hyaluronan-binding protein RHAMM in adult and developing rat brain.** *J Comp Neurol* 2001, **439**:315-330.
174. Goto F, Straka H, Dieringer N: **Expansion of afferent vestibular signals after the section of one of the vestibular nerve branches.** *J Neurophysiol* 2000, **84**:581-584.
175. Jones LL, Margolis RU, Tuszynski MH: **The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury.** *Exp Neurol* 2003, **182**:399-411.
176. Jones FS, Jones PL: **The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling.** *Dev Dyn* 2000, **218**:235-259.
177. Gliddon CM, Darlington CL, Smith PF: **GABAergic systems in the vestibular nucleus and their contribution to vestibular compensation.** *Prog Neurobiol* 2005, **75**:53-81. Epub 2005 Jan 2001.
178. Brown JJ, Papaioannou VE: **Ontogeny of hyaluronan secretion during early mouse development.** *Development* 1993, **117**:483-492.

179. Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lenas P, Yamada Y, Imagawa M, Shinomura T, Hamaguchi M, Yoshida Y, Ohnuki Y, et al.: **Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties.** *J Biol Chem* 1999, **274**:25085-25092.
180. Fraher JP, Sheehan MM: **The CNS-PNS transitional zone of rat cervical dorsal roots during development and at maturity. A morphological and morphometric study.** *J Anat* 1987, **152**:189-203.
181. Tardy M: **Role of laminin bioavailability in the astroglial permissivity for neuritic outgrowth.** *An Acad Bras Cienc* 2002, **74**:683-690. Epub 2003 Jan 2024.
182. Weiss PA: *Nervous System*. Edited by Willier BH, Weiss PA, Hamburger V. Philadelphia: Saunders, W.B.; 1955.
183. Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR: **Laminin--a glycoprotein from basement membranes.** *J Biol Chem* 1979, **254**:9933-9937.
184. Baranes D, Lederfein D, Huang YY, Chen M, Bailey CH, Kandel ER: **Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway.** *Neuron* 1998, **21**:813-825.
185. Madani R, Hulo S, Toni N, Madani H, Steimer T, Muller D, Vassalli JD: **Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice.** *Embo J* 1999, **18**:3007-3012.
186. Gordon-Weeks PR, Golding JP, Clarke JD, Tonge D: **A study of the expression of laminin in the spinal cord of the frog during development and regeneration.** *Exp Physiol* 1992, **77**:681-692.
187. Song HJ, Ming GL, Poo MM: **cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones.** *Nature* 1997, **388**:275-279.
188. Gonzalez ML, Silver J: **Axon-glia interactions regulate ECM patterning in the postnatal rat olfactory bulb.** *J Neurosci* 1994, **14**:6121-6131.
189. Laywell ED, Dorries U, Bartsch U, Faissner A, Schachner M, Steindler DA: **Enhanced expression of the developmentally regulated extracellular matrix molecule tenascin following adult brain injury.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**:2634-2638.
190. Faissner A, Kruse J: **J1/tenascin is a repulsive substrate for central nervous system neurons.** *Neuron* 1990, **5**:627-637.
191. Meiners S, Nur-e-Kamal MS, Mercado ML: **Identification of a neurite outgrowth-promoting motif within the alternatively spliced region of human tenascin-C.** *J Neurosci* 2001, **21**:7215-7225.
192. Matsui F, Nishizuka M, Yasuda Y, Aono S, Watanabe E, Oohira A: **Occurrence of a N-terminal proteolytic fragment of neurocan, not a C-terminal half, in a perineuronal net in the adult rat cerebrum.** *Brain Res* 1998, **790**:45-51.
193. Bartolami S, Auge C, Travo C, Venteo S, Knipper M, Sans A: **Vestibular Schwann cells are a distinct subpopulation of peripheral glia with specific sensitivity to growth factors and extracellular matrix components.** *J Neurobiol* 2003, **57**:270-290.
194. Braga-de-Souza S, Lent R: **Temporal and spatial regulation of chondroitin sulfate, radial glial cells, growing commissural axons, and other hippocampal efferents in developing hamsters.** *J Comp Neurol* 2004, **468**:217-232.
195. Matthiessen HP, Schmalenbach C, Muller HW: **Astroglia-released neurite growth-inducing activity for embryonic hippocampal neurons is associated with laminin bound in a sulfated complex and free fibronectin.** *Glia* 1989, **2**:177-188.
196. Sheppard AM, Brunstrom JE, Thornton TN, Gerfen RW, Broekelmann TJ, McDonald JA, Pearlman AL: **Neuronal production of fibronectin in the cerebral cortex during**

- migration and layer formation is unique to specific cortical domains. *Dev Biol* 1995, **172**:504-518.
197. Yamaguchi Y: **Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix.** *Cell Mol Life Sci* 2000, **57**:276-289.
 198. Matthews RT, Kelly GM, Zerillo CA, Gray G, Tiemeyer M, Hockfield S: **Aggrecan glycoforms contribute to the molecular heterogeneity of perineuronal nets.** *J Neurosci* 2002, **22**:7536-7547.
 199. Allendoerfer KL, Durairaj A, Matthews GA, Patterson PH: **Morphological domains of Lewis-X/FORSE-1 immunolabeling in the embryonic neural tube are due to developmental regulation of cell surface carbohydrate expression.** *Dev Biol* 1999, **211**:208-219.
 200. Baig S, Wilcock GK, Love S: **Loss of perineuronal net N-acetylgalactosamine in Alzheimer's disease.** *Acta Neuropathol* 2005, **30**:30.
 201. Liuzzi FJ, Tedeschi B: **Peripheral nerve regeneration.** *Neurosurg Clin N Am* 1991, **2**:31-42.
 202. Doucette JR: **The glial cells in the nerve fiber layer of the rat olfactory bulb.** *Anat Rec* 1984, **210**:385-391.
 203. Schwab ME: **Molecules inhibiting neurite growth: a minireview.** *Neurochem Res* 1996, **21**:755-761.
 204. Bovolenta P, Wandosell F, Nieto-Sampedro M: **CNS glial scar tissue: a source of molecules which inhibit central neurite outgrowth.** *Prog Brain Res* 1992, **94**:367-379.
 205. Davies SJ, Field PM, Raisman G: **Embryonic tissue induces growth of adult axons from myelinated fiber tracts.** *Exp Neurol* 1997, **145**:471-476.
 206. Zaccaria ML, Di Tommaso F, Brancaccio A, Paggi P, Petrucci TC: **Dystroglycan distribution in adult mouse brain: a light and electron microscopy study.** *Neuroscience* 2001, **104**:311-324.
 207. Moukhles H, Carbonetto S: **Dystroglycan contributes to the formation of multiple dystrophin-like complexes in brain.** *J Neurochem* 2001, **78**:824-834.
 208. Khurana TS, Watkins SC, Kunkel LM: **The subcellular distribution of chromosome 6-encoded dystrophin-related protein in the brain.** *J Cell Biol* 1992, **119**:357-366.
 209. Woessner JF, Nagase H: *Matrix metalloproteinases and TIMPs*. Oxford: Oxford University Press; 2000.
 210. Sekine-Aizawa Y, Hama E, Watanabe K, Tsubuki S, Kanai-Azuma M, Kanai Y, Arai H, Aizawa H, Iwata N, Saido TC: **Matrix metalloproteinase (MMP) system in brain: identification and characterization of brain-specific MMP highly expressed in cerebellum.** *Eur J Neurosci* 2001, **13**:935-948.
 211. Vaillant C, Didier-Bazes M, Hutter A, Belin MF, Thomasset N: **Spatiotemporal expression patterns of metalloproteinases and their inhibitors in the postnatal developing rat cerebellum.** *J Neurosci* 1999, **19**:4994-5004.
 212. Frey U, Morris RG: **Synaptic tagging: implications for late maintenance of hippocampal long-term potentiation.** *Trends Neurosci* 1998, **21**:181-188.
 213. Wu C, Keivens VM, O'Toole TE, McDonald JA, Ginsberg MH: **Integrin activation and cytoskeletal interaction are essential for the assembly of a fibronectin matrix.** *Cell* 1995, **83**:715-724.
 214. Jacobson C, Montanaro F, Lindenbaum M, Carbonetto S, Ferns M: **alpha-Dystroglycan functions in acetylcholine receptor aggregation but is not a coreceptor for agrin-MuSK signaling.** *J Neurosci* 1998, **18**:6340-6348.

215. Werner A, Willem M, Jones LL, Kreutzberg GW, Mayer U, Raivich G: **Impaired axonal regeneration in alpha7 integrin-deficient mice.** *J Neurosci* 2000, **20**:1822-1830.
216. Condic ML: **Adult neuronal regeneration induced by transgenic integrin expression.** *J Neurosci* 2001, **21**:4782-4788.
217. Fox K: **The critical period for long-term potentiation in primary sensory cortex.** *Neuron* 1995, **15**:485-488.
218. Bliss TV, Collingridge GL: **A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus.** *Nature* 1993, **361**:31-39.
219. Dityatev A, Schachner M: **Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity.** *Nat Rev Neurosci* 2003, **4**:456-468.
220. Szklarczyk A, Lapinska J, Rylski M, McKay RD, Kaczmarek L: **Matrix metalloproteinase-9 undergoes expression and activation during dendritic remodeling in adult hippocampus.** *J Neurosci* 2002, **22**:920-930.
221. Tomimatsu Y, Idemoto S, Moriguchi S, Watanabe S, Nakanishi H: **Proteases involved in long-term potentiation.** *Life Sci* 2002, **72**:355-361.
222. Enekd B, King JA, Stylli S, Paradiso L, Kaye AH, Novak U: **Overexpression of hyaluronan synthase-2 reduces the tumorigenic potential of glioma cells lacking hyaluronidase activity.** *Neurosurgery* 2002, **50**:1311-1318.
223. Spicer AP, Joo A, Bowling RA, Jr.: **A hyaluronan binding link protein gene family whose members are physically linked adjacent to chondroitin sulfate proteoglycan core protein genes: the missing links.** *J Biol Chem* 2003, **278**:21083-21091. Epub 22003 Mar 21027.
224. Sivron T, Schwartz M: **Glial cell types, lineages, and response to injury in rat and fish: implications for regeneration.** *Glia* 1995, **13**:157-165.
225. Margolis RU, Margolis RK: **Chondroitin sulfate proteoglycans as mediators of axon growth and pathfinding.** *Cell Tissue Res* 1997, **290**:343-348.

12. KÖZLEMÉNYEK

A TÉZISEKET MEGALAPOZÓ IN EXTENSO KÖZLEMÉNYEK

1. Matesz C, Bácskai T, Nagy É, **Halasi G**, Kulik Á: Efferent connections of the vestibular nuclei in the rat: A comparative neuromorphological study. Brain Res Bull. 57: 313-315. 2002. **IF: 2.283**
2. **Halasi G**, Bácskai T, Matesz C: Connections of the superior vestibular nucleus with the oculomotor and red nuclei in the rat: An electron microscopic study. Brain Res Bull. 66:532-5. 2005 **IF: 2.283**

EGYÉB IN EXTENSO KÖZLEMÉNYEK:

1. Matesz C, Modis L, **Halasi G**, Szigeti ZM, Felszeghy S, Bácskai T, Székely G: Extracellular matrix molecules and their possible roles in the regeneration of frog nervous system. Brain Res Bull. 66:526-31. 2005 **IF: 2.283**
2. Rácz E, Bácskai T, **Halasi G**, Kovács E, Matesz C: Organization of dye-coupled cerebellar granule cells labeled from afferent vestibular and dorsal root fibers in the frog, *Rana esculenta*. Submitted to JCN.
3. Szigeti ZM, Matesz C, Székely G, Felszeghy S, Bácskai T, **Halasi G**, Mészár Z, Modis L: Distribution of hyaluronic acid in the central nervous system of the frog. Submitted to JCN.
4. **Halasi G**, Bácskai T, Wolf E, Módis L, Székely G, Mészár Z, Szigeti ZM, Matesz C: Vestibular lesion-induced changes in the expression of the hyaluronan in the frog, *Rana esculenta*. In preparation Exp Brain Res.

Megjelent közlemények összesített impakt faktora: 6,849 Független idézetek száma: 4

A TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KONGRESSZUSI ABSZTRAKTOK:

1. Matesz C, **Halasi G**, Bácskai T: Antero- and retrograde connections of the descending vestibular nucleus in the rat. Magyar Idegtudományi Társaság Kongresszusa, Szeged, 2001. Neurobiology.9. 228-229.

2. Matesz C, Bácskai T, Nagy É, **Halasi G**, Kulik A: Anterograde connections of the vestibular nuclei in the rat: A comparative neuromorphological study. 3rd European Conference on Comparative Neurobiology, Murcia, Spanyolország, 2001.
3. Bácskai T, **Halasi G**, Matesz C: Comparative study on the afferent connections of the lateral vestibular nucleus in the frog and rat. Magyar Idegtudományi Társaság Kongresszusa, Budapest, 2002. Clinical Neurosci. 56:2.6.
4. Bácskai T, **Halasi G**, Matesz C: Electronmicroscopical studies on the mesencephalic termination areas of the rat vestibular nuclei. Magyar Idegtudományi Társaság Kongresszusa, Balatonfüred, 2003. Clinical Neurosci. 56:2.
5. Matesz C, Módis L, Szigeti ZM, Felszeghy S, Bácskai T, **Halasi G**, Székely G: Extracellular matrix molecules in the nervous system of the frog. Magyar Idegtudományi Társaság Kongresszusa, Balatonfüred, 2003. Clinical Neurosci. 56:2 57.
6. Szigeti ZM, Módis L, Matesz C, Felszeghy S, Bácskai T, **Halasi G**, Székely G: Hyaluronan distribution pattern in the nervous system of the frog. Magyar Idegtudományi Társaság Kongresszusa, Balatonfüred, 2003. Clinical Neurosci. 56:2 86-87.
7. **Halasi G**, Bácskai T, Módis L, Székely G, Matesz C: Vestibular lesion-induced changes in the expression of the extracellular matrix molecules in the frog. IBRO International Workshop, Budapest, 2004. Clinical Neurosci. 57: 1. 22.
8. Szigeti ZM, Matesz C, Bácskai T, **Halasi G**, Székely G, Módis L: Distribution of tenascin-C and fibronectin in the nervous system of the frog. IBRO International Workshop, Budapest, 2004. Clinical Neurosci. 57: 1. 65.
9. **Halasi G**, Bácskai T, Matesz C: Connections between the superior vestibular nucleus and the oculomotorius and red of the rat: An electronmicroscopical study. 4th European Conference on Comparative Neurobiology: Evolutionary Development Biology of Brains, Congress Book of 4th ECCN. Oxford. 2004.
10. Matesz C, Módis L, **Halasi G**, Szigeti ZM, Felszeghy S, Bácskai T, Székely G: Extracellular matrix molecules and their possible role in the regeneration of frog nervous system. Congress Book of 4th ECCN. Oxford. 2004.

11. **Halasi G**, Matesz C, Jancsik V: Expression of dystrophin-glycoprotein complex in the nervous system of the frog. Magyar Idegtudományi Társaság Kongresszusa, Pécs, 2005. Clinical Neurosci. In press.

EGYÉB KONGRESSZUSI ABSZTRAKTOK:

1. Bácskai T, **Halasi G**, Matesz C: Synaptic connections on the hypoglossal nucleus of the frog. IBRO International Workshop, 2004. Budapest. Clinical Neurosci. 57:1. 4.
2. Bácskai T, Veress G, **Halasi G**, Matesz C: Involvement of the vestibular system in the prey catching behavior of the frog. Magyar Idegtudományi Társaság Kongresszusa, 2005. Pécs. Clinical Neurosci. In press.
3. Rácz E, Bácskai T, **Halasi G**, Matesz C: Dye-coupled connections of the primary afferent vestibular fibers in the cerebellum of the frog. 1st International Conference on Basic and Clinical Immunogenomics, Budapest, 2004. Tissue Antigens 64: 317-441.
4. Rácz E, Kovács E, Bácskai T, **Halasi G**, Matesz C: Dye-coupled connections of the primary afferent fibers in the cerebellum of the frog. Magyar Idegtudományi Társaság Kongresszusa, 2005. Pécs. Clinical Neurosci. In press.

13. FÜGGELÉK: ECM MOLEKULÁK AZ IDEGRENDSZERBEN – ÖSSZEFOGLALÓ TÁBLÁZAT

(félkövér betűkkel a saját eredményeket jelöltük, a felsőindexben jelzett számok az irodalomjegyzékben található referenciákra utalnak)

Név	Szintézis helye	Receptorok, ligandok	Az idegi regenerációra kifejtett hatások	Előfordulás				
				Perifériás idegrendszer	TZ	Központi idegrendszer		
						Fehérállomány	Szürkeállomány	PN
Glycosaminoglycanok								
Hyaluronsav (HA)	Glia (astrocyta) ⁸¹ Idegsejtek? HAS-2, -3 ⁸⁰ Mesoderma eredetű sejtekben HAS-1, -2, -3 ⁸²	CD44 ⁶⁶ RHAMM ⁸⁸ RHAMM és CDC37 intracellulárisan is TGF-β és FGF P125 (FAK), p42/44 ERK kináz ^{86, 173}	Non permisszív (crista neuralis (CN) sejtek migrációjában) ⁴³ , nem gátló a perifériás idegekben (serkentő) ^{91, 93}	Negatív (-)	++	pozitív (+) axonok körül, kiv. Tractus solitariusban és subependymalisan Patkányban: Ranvier befűződéseknel, és myelin hüvelyben ⁹²	pozitív (+) +/- gv. hátsó szarv, Cc körül Patkányban: kisagyban magok, szemcse- és Purkinje sejtek körül, Idegsejtek cytoplasmájában és a sejtmagban is ⁹²	++ agytörzsi magok, FR nagy sejtek, gerincvelői moto-neuron + ⁵³
Glycoproteinek								
Laminin	Astrocyták ¹⁸¹	CD44 ⁶⁶ Integrinek ($\alpha_1\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_7\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$) ^{96, 191} G-proteinhez csatolt proteoglycan, B-amyloid precursor protein (APP) ¹⁹¹ A-Dystroglycan ¹²⁶	Permisszív ¹⁸³ Neuritek növekedését serkenti, szinapszisok kialakítása ¹⁰³	Erősen pozitív (++) Egyes Schwann sejtek mentén (n. ischiadicusban, de a n. vestibulárisban nem) ¹⁹³	++	Negatív (-) Csak a lamina basalisokban és az agyburkokban ¹⁸⁶	Negatív (-) Csak a lamina basalisokban ¹⁸⁶	Negatív (-)
Fibronectin	Astrocyták ¹⁹⁵	CD44 ⁶⁶ Integrinek ($\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_{IIB}\beta_3$, $\alpha_V\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_V\beta_6$, $\alpha_X\beta_1$), HS-PG ¹⁴¹	Permisszív ⁹⁵ (CN sejt migrációban is) Egyes esetekben non-permisszív ⁹⁵	Pozitív (+) axonok körül Patkányban: Glia ¹⁹⁵	+	+ TZ-hez közel, és a gv.-ben commissuralisak, +/- több rész	Negatív (-) neuropil, +/- cytoplasma	Pozitív (+)
Tenascin (TN)	TN-C: Astrocyták, Radier glia ^{52, 81} , Éretlen idegsejtek ¹⁰⁶ TN-R: Oligodendroglia ¹⁰⁷	Integrinek ($\alpha_V\beta_3$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$) ¹⁹¹ , foszfatidil- β/ζ ¹⁰⁶ GFAP, CS-PG-ok ⁴³ TN-R: contactin, IgCAM, TAG-1/axonin-1, syndecan ^{54, 107}	Non-permisszív (CN sejtek esetében, illetve más esetben is ¹⁹⁰) Permisszív (F3/contactinon keresztül kifejtett hatás)	+/- axonok körül	++	+ agytörzsben, gv.-ben axonok körül, ++ TZ-hez közel, fasc. lat és post, Patkányban: Bergman glia, oligodendroglia ¹⁰⁷	Negatív (-) neuropil Patkányban: hypothalamus magokban ⁷⁰	Erősen pozitív (++)

Név	Szintézis helye	Receptorok, ligandok	Az idegi regenerációra kifejtett hatásuk	Előfordulás				
				Perifériás idegrendszer	TZ	Központi idegrendszer		
						Fehérállomány	Szürkeállomány	PN
Proteoglycanok								
Phosphacan	Astrocyták ^{46, 75}	Contactin (idegsejteken expresszáldó Ig adhézios molekula), Nr-CAM ⁷⁶ Tenascin-C és -R ⁶² Mindegyik CS-PG kapcsolódik lamininhoz, fibronectinhez, tenascinhoz, HA-val, kollagénekkel ^{51, 68}	Egyes esetekben permisszív ⁷⁷ Non-permisszív ⁶¹	Közepesen erős (+/-) axonok körül	++	++ vestibuláris rostok körül, fasc. ant. és lat.-ban, naptári napkép, +/- másutt	+/- Patkányban: kisagy cortex neuropil, és nem piramidális sejtek körül ⁶²	Erősen pozitív (++) + kisagyi sejtek ⁶²
Versican	Oligodendrocyták, Schwann sejtek ⁵²	Glycolipidek ¹⁹⁷ CD44 ⁵⁴	Non-permisszív ^{55, 56} Vagy egyes esetekben permisszív ^{47, 57, 58}	Patkányban: Schwann sejtek ⁵²		Patkányban oligodendrocyta GFAP-vel és GHAP-vel ⁵³		+ ⁵³
Neurocan	Idegsejtek (kisagyi granuláris sejtek és Purkinje sejtek), Astrocyták ⁶⁰	Glycolipidek CD44 ⁵⁴ N-CAM, Ng-CAM, Nr-CAM, contactin, tenascin-C és -R, axionin, HB-GAM ^{61, 62}	Non-premisszív ^{56, 63}			Patkányban: astrocyták ⁷⁵	Patkányban: kisagyi granularis sejtek, Purkinje sejtek ⁷⁵	
Brevican	Kisagyi astrocyták, Oligodendrocyták ⁶⁴	Glycolipidek CD44 ⁶⁶	Non-premisszív ^{56, 63} Vagy egyes esetekben permisszív ^{47, 57, 58}			Patkányban: kisagyi astrocyta, oligodendrocyta ⁶⁴		
Aggrecan	Idegsejtek ⁶⁹	Glycolipidek, Tenascin-C és -R ⁷⁰ CD44 ^{54, 66}	Permisszív ⁵⁵ vagy non-premisszív ⁴⁷ (glikozilációtól függően) ⁷¹			Csirkében: idegsejteken a cortex, hippo-campus, thalamus, substantia nigra, zona incerta, kisagyi magok, agytörzsi magok, colliculusok, gerincvelő területén ¹⁹⁸	Csirkében nincs ¹⁹⁸	