

**Az extracellularis matrix makromolekuláinak
szerveződése patkány és béka vestibularis
magkomplexumában, és szerepe a vestibularis
compensatióban**

GAÁL BOTOND

TÉMAVEZETŐ: PROF. DR. MATESZ KLÁRA



**DEBRECENI EGYETEM
FOGORVOSTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA**

DEBRECEN, 2014.

Az extracelluláris matrix makromolekuláinak szerveződése patkány és béka vestibularis magkomplexumában, és szerepe vestibularis compensatióban

ÉRTEKEZÉS A DOKTORI (PHD) FOKOZAT MEGSZERZÉSE ÉRDEKÉBEN A „KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK” TUDOMÁNYÁGBAN

GAÁL BOTOND,
OKLEVELESKÖRNYEZETGAZDÁLKODÁSI AGRÁRMÉRNÖK

TÉMAVEZETŐ: PROF. DR. MATESZ KLÁRA

DEBRECENI EGYETEM
FOGORVOSTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

A Szigorlati Bizottság elnöke:

A Szigorlati bizottság tagjai:

Prof. Dr. Márton Ildikó, az MTA doktora

Prof. Dr. Elekes Károly, az MTA doktora

Prof. Dr. Szűcs Géza, az MTA doktora

A Doktori Szigorlat Helye, Időpontja:

DE Fogorvostudományi Kar, 210. tanterem,
2014. november 10., 11:30 óra.

A Bírálóbizottság elnöke:

A Bírálóbizottság tagjai:

Prof. Dr. Márton Ildikó, az MTA doktora

Dr. Alpár Alán, PhD

Dr. Klekner Álmos, PhD

Az Értekezés Védésének Időpontja:

2014. november 10., 13:30 óra.

Az Értekezés Védésének Helye:

DEÁOK, Belgyógyászati Intézet 'A'
épületének tanterme.

BEVEZETÉS

EXTRACELLULARIS MATRIX A KÖZPONTI IDEGRENSZERBEN

A gliasejtek és neuronok közötti intercellularis tér a központi idegrendszer teljes térfogatának mintegy 10-20 %-át teszi ki. Ezen extracellularis terekben alkotnak hálózatot az extracellularis matrix (ECM) makromolekulái, és biztosítanak fízziológias környezetet az idegrendszer sejtés elemeinek működéséhez. Az ECM molekulái idegsejtekben vagy gliában termelődnek, majd extracellularisan építenek fel glucosaminoglycanokból és proteoglycanokból álló sűrű hálózatot.

ECM molekulák funkciója a központi idegrendszerben

- (1) A kifejlett idegrendszerben az ECM jelentős negatív töltéstöbblete révén részt vesz *vízoldható és membránkötött molekulák*, ill. *ionok forgalmában*, exrtacellularis *egyensúlyának fenntartásában*.
- (2) A perikaryon,dendritek proximalis segmentumai, az axon eredési domb és axonok preterminalis szakaszai körüli ECM akkumuláció a *synapticus kapcsolatok morfológiájának fontos stabilizálói*.
- (3) *Neuronok aktivitásának befolyásolói ép és pathológiás állapotokban*, s *vice versa*, a neuronok aktivitása meghatározza a matrix molekuláris összetételét és halmozódását.
- (4) Egyes sejtfelszíni receptorokhoz vagy synthase-okhoz kapcsolódó matrixalkotók cytoskeletális elemekhez való kihorgonyzása révén *jelátviteli kaszkádok szereplői*.
- (5) Az elmúlt évtized kutatása alapján az ECM perisynapticus szerepe felértékelődött.Az új terminológia szerint az *ECM molekulákataz ún. négykomponensű*, vagy *'tetrapartite' synapsisok alkotórészének tekintik*.
- (6) Az idegrendszer fejlődése során specifikus matrix komponensek termelődnek meghatározott idő- és térbeli sorrendben, amellyel a *sejtmigrációt és az újonnan lefűződő neuronok elköteleződését szabályozzák*.

- (7) Kísérletesen bebizonyosodott, hogy a *központi idegrendszer gliomáinak perivascularis vagy periaxonalis inváziójában* a tumorsejtek által megváltoztatott *ECM a sejt migráció médiuma*.

ECM szerveződése a központi idegrendszerben

ECM molekulák az központi idegrendszer különböző kompartmentjeiben jelennek meg, az alábbiakban felsorolt diffúz vagy kondenzált formákban.

- (1) A cerebrovascularis rendszer endotheliumát borító *membrana basalis*-ban barrier funkciót töltenek be. Kollagén, entactin, fibronectin, dystroglycan és perlecan molekulák alkotják, s a vér-agy gát kialakításában vesznek részt.
- (2) A perineuronális net (PNN) egy tömött hálózatos matrix állomány, amelyet ECM molekulák akkumulációja épít fel neuronok sejttestje, dendritek proximális szakaszai, valamint axonok eredése körül. A PNN szövettani jelölésével kirajzolódik a perikaryon és a nyúlványok proximális szakaszai, és mint akkumuláció, jól elkülöníthető a matrix molekulákat kevésbé halmozó neuropiltól. Elsődleges felépítő molekulái a hyaluronsav (HA), chondroitin sulfat proteoglycanok (CSPG), tenascin-R, és különböző link proteinek.
- (3) Az idegrendszeri interstitialis matrix az agyi parenchyma interneuronális kompartmentjeiben elhelyezkedő ECM, amely nem tart fenn kapcsolatot a membrana basalis-szal vagy PNN-tel; e diffúz mátrixot neuropilnek tekintjük.
- (4) Axonok preterminális szegmentumát és boutonokat beborító matrix akkumulációt az utóbbi években írták le az előbbiektől különböző matrix formaként, a terminológiába ún. 'axonal coat'-ként került be.
- (5) Vastag myelinizált axonkötegek mentén, a Ranvier féle befűződésekben, helyezkedik el az ún. perinodális matrix. A versican, brevican, tenascin-R, és link proteinek ionrezervoirként szolgálnak saltatoricus ingerület.

ECM molekuláris összetétele a központi idegrendszerben

Hyaluronsav

A HA a D-glucuronsav és N-acetylglucosamin ismétlődő dimeréből felépülő nem szulfatált szénhidrát polymer. A láncok hossza elérheti 25.000 dimer hosszát. Az igen egyszerű struktúra ellenére a hyaluronsav komplex másodlagos és harmadlagos szerkezetet formál, eltérő méretekben és térbeli konformációkban. Az extracelluláris térben az ECM fő szervező molekulájaként funkcionál, különös tekintettel a PNN-ekben betöltött szerepére. A HA egy glucosaminoglycan (GAG), ami nem kötődik kovalensen proteinekhez az extracelluláris térben, s így nem formál proteoglycanokat. Gerincesekben szerkezetét tekintve konzervatív molekula, amely ubiquiter, azaz megtalálható az idegszöveten kívül szövetek nagyrésztében is. Nagy negatív töltéstöbblettel rendelkezik, ezért az intercelluláris térben nagy mennyiségű kationt, vizet, és egyéb extracellulárisan mozgó molekulát csapdázza.

Chondroitin szulfat proteoglycanok

A CSPG-k általánosságára jellemző az ún. 'core-protein' vagy tengelyfehérje, amihez kovalensen kötődnek a szulfát GAG-ok. A GAG láncok hosszú lineáris szénhidrát polymer molekulák; alapegységei a D-glucuronsavból és N-acetylgalactosaminból álló dimerek, β -glikozidos kötésben. A CSPG-k családjába számos molekulatípus tartozik, ám jelen munka csak a HA-hoz kötődő ún. lecticanokra tér ki, ezek az aggrecan, versican, neurocan, és brevican.

Aggrecan

A core proteinhez kötött szulfatált GAG-ok számának változékonysága miatt molekulatömege 1-3 MDa. A tengelyfehérje mintegy 300 kDa méretű lineáris molekula, s a GAG-ok kapcsolódási helyein vannak rajta glycozilált szerin maradványok. Három globuláris doménnel, a G1, G2 és G3 rendelkezik. A G2 domén kizárólag az aggrecanra jellemző, a többi lectican tengelyfehérjéjében nem szerepel. HA-hoz a G1 doménen keresztül képes kapcsolódni, amely egyben az N-terminális vége is, míg C-terminális végét a G3 domén hordozza. GAG szubsztituensek a G2 és G3 domének közötti hosszú tengelyfehérje szakaszhoz kapcsolódnak. A GAG láncok két típusa, a chondroitin szulfat valamint a keratan szulfat láncok kapcsolódnak az aggrecan core protein-hez.

Brevican

A lecticanok általános szerkezetéhez hasonlóan a globuláris szerkezetű N-terminális G1 domén kapcsolódik a HA-hoz, C-terminális vége pedig az G3 domén. A tengelyfehérjéhez kis számban kapcsolódnak chondroitin sulfat GAG oldalláncok, 1-5 darab. A molekula 140 kDa súlyú, az aggrecannál számottevően rövidebb, illetve kevesebb GAG szubsztituenst tartalmaz.

A brevican az aggrecan után a legnagyobb mennyiségben előforduló PNN alkotó molekula, termelődése jelen tudásunk szerint csak az idegrendszerben történik. Jelen van ezen túl perisynapticusan és a synapticus részben is, illetve axon iniciális szegmentumai körül is leírták *in vivo* és *in vitro* tanulmányokban. Egyes Ranvierféle befűződésekben is megtalálható.

Neurocan

A neurocan egy idegszövet specifikus CSPG, szerkezete tükrözi a CSPG-k általános szerkezetét. A tengelyfehérje N-terminális G1 doménjén dupla immunglobulin szerű hurokkal kapcsolódik a hyaluronsavhoz. A C-terminális G3 domén pedig a tenascin glycoproteinekhez kapcsolódva alakít ki térhálós szerkezetet. A neurocan 245 kDa-os hasítatlan formája csak fejlődő idegrendszerben van jelen, ám az idegrendszer további fejlődése/érése során enzimatis hasítást szenved, és 150 kDa-os N-terminális, valamint 130 kDa-os C-terminális fragmentumok formájában marad az extracellularis térben. Hozzájárul a PNN felépítéséhez, illetve akkumulációja megjelenik a Ranvierféle befűződésekben is.

Versican

A versican számos más lágy szövetben előforduló proteoglycan. Core-proteinjének szerkezete a CSPG-k általános szerkezetét tükrözi, a G1 HA kötő régió, ill. a G3 C-terminális véggel, mely utóbbin kapcsolódnak epidermal growth factor modulok, C-típusú lektin, és egy kiegészítő szabályozó régió. A versican is módosul az idegrendszer fejlődése során. A G1 és G3 domének közötti régiójának szerkezetét két exon rögzíti, amelyek splice variánsai specifikálják a chondroitin sulfat kötő régiót, azaz a kapcsolható GAG típusokat. A versican négy típusát azonosították eddig, ezek V0; V1; V2; és V3.

Felnőtt idegrendszerében a V2 isoforma van jelen, amelyhez 5-8 α GAG kötődik kovalensen, és kizárólag a központi idegrendszerben expresszálódik, molekulatömege 400 kDa. Szövettani metszeten végzett immunhisztokémiai jelöléssel, a többi lecticanra nem jellemző, pontszerű megjelenést mutat. Leírt és feltételezett akkumulációi perisynapticus résekben, vagy Ranvier féle befűződésekben vannak, vastag myelinizált axonkötegek mentén.

Glycoproteinek

Tenascinok

Több tenascin molekula összekapcsolódásával nagy kiterjedésű glycoproteineket alkotnak az extracelluláris térben, amelyek CSPG-k C-terminális végeihez kapcsolódva alakítanak ki térhálós szerkezetet. Típusai a tenascin-R, -C, -X, -W, (és -N). Jelen munka csak a tenascin-R-t kutatja, így a továbbiakban ezt tárgyalja.

A tenascin-R 4,5 epidermal growth factor-t, 9 fibronectin-III szakaszt tartalmaz, két splice variánsa pedig 160, ill. 180 kDa molekulatömegű. A tenascin-R három alegységből a C-terminális végeknél összekapcsolt multimer szerkezet, amely így a HA-CSPG-tenascin-R háromtagú térszerkezetet stabilizálja. A tenascinok CSPG-kon kívül sejtfelszínhez is képesek kihorgonyzódni fibronectin-III modulokon keresztül.

Link proteinek

A link proteinek szintén a glycoproteinek családjába tartozó molekulák. Funkciójuk a HA és lecticanok közötti kapcsolat stabilizálása, matrix aggregátumok összetartása. Négy féle link proteint írtak le eddig, a HAPLN1 (hyaluronan and proteoglycan link protein 1), HAPLN2, HAPLN3 (idegrendszerben nincs jelen), és a HAPLN4. Link proteinek nélkül matrix aggregátumok instabilak, PNN formáció nem alakul ki.

A HAPLN1 egy rövid polypeptid, amelynek N-terminális végén Ig-szerű hurok található, C-terminális végén pedig proteoglycan kötő dupla hurkok. Molekulatömege 41, 44, vagy 48 kDa.

A VESTIBULARIS MAGKOMPLEXUM

A vestibularis rendszer felelős a fej helyzetének és mozgásainak, illetve térbeli helyzetének gravitáció irányához viszonyított érzékeléséért. A mozgások érzékelésén túl a vestibularis rendszer szabályozza a testtartást, szemmozgásokat és a tekintés stabilizálását/fixálását a külső szemmozgató izmok beidegzésén keresztül, egyensúlyozást a törzs és végtagok antigravitációs izmainak tónusának szabályozásán keresztül, illetve a vegetatív funkciót kiterjedt agytörzsi, kisagyi, thalamicus és gerincvelői kapcsolatai révén.

A vestibularis rendszer perifériás része a belső fülben található. Érzékhámsejtek az *utricleus* és *sacculus* maculáiban, illetve a félkörös ívjáratok *crista ampullaris*aiban vannak, kétültűekben ezeken kívül a *lagenában* is. A bipoláris ganglionsejtek centralis nyúlványai a vestibularis magkomplexumban végződnek, az agytörzsben.

A vestibularis magkomplexum patkányban

Patkány vestibularis magkomplexuma, a vestibularis rendszer relatíve konzervatív jellege folytán, sok pontban közös más emlős fajokéval. Négy vestibularis mag fogadja a belső fülből érkező ingerületet; ezek a *nucleus vestibularis superior* (NVS), *lateralis* (NVL), *medialis* (NVM), valamint a *descendens* (NVD). A magok a nyúlvelő nyílt részének, és a híd tegmentumának laterális részében találhatók. Rostrálisan a negyedik agykamra *recessus laterális*ának szintjéig ér, caudálisan pedig a *nucleus motorius nervi hypoglossi* magjánál végződik.

Nucleus vestibularis superior: A magot alkotó neuronok kétharmada közepes méretű, ezek mellett nagy és óriás méretű neuronok is találhatók. A nagyméretű sejtek centrális pozícióban helyezkednek, míg a közepes és kis méretű neuronok a mag perifériájára orientáltak.

A nagy neuronok inhibitoros kapcsolatot létesítenek a *nervus oculomotorius* és trochlearis középagyi magjaiban, a kisméretűek pedig kisagyi, *formatio reticularis*, és *commissuralis* kapcsolatot tartanak fenn.

Nucleus vestibularis lateralis: A vestibularis magkomplexumon belül a legnagyobb sejtek a NVL-ban vannak. A mag neuronjainak mintegy fele nagy, illetve óriás méretű, s a neuronok kisebb része közepes vagy kis méretű, egyenletes eloszlásban rostrocaudalisán és a mag keresztmetszetében. A mag rostralis része a félkörös ívjáratokból és az utriculusból kap bemenetet, és a szemmozgató agyidegek magjaihoz projiciál, amivel részt vesz a vestibulo-ocularis reflex (VOR) kialakításában, illetve gerincvelői kapcsolataival a vestibulo-spinalis pályák kialakításában is. A NVL caudalis része az *oliva inferior*ból és a *formatio reticularis*ból fogad bemenetet, és a gerincvelőbe projiciál.

Nucleus vestibularis medialis: A NVM morfológiailag és funkcionálisan két jól elkülöníthető almagra osztható. A magnocellularis részét ventrolateralisan elhelyezkedő nagy és közepes méretű neuronok alkotják. Bemeneteit a félkörös ívjáratokból és kisagyból kapja, efferensei pedig a szemmozgató agyidegi magokban és a gerincvelőben végződnek. A mag parvocellularis részét dorsomedialisán elhelyezkedő dominánsan kisméretű neuronok alkotják. Afferenciát az *otolith* szervekből kapja, efferens rostjai pedig az *oliva inferior*ban, kisagyban és ellenoldali NVM-ban végződnek.

Nucleus vestibularis descendens: A magban található neuronok több mint fele közepes méretű, és kisebb számban találhatók nagy, vagy óriás méretű sejtek. A NVL rostralis és caudalis részei között nagy morfológiai különbség mutatkozik, amely megjelenik funkció szinten is. A rostralis pozíciójú nagy és óriás neuronok oculomotoros és gerincvelőiefferensek. A caudalis rész kis méretű neuronjai pedig a *nucleus tractus solitarius*, *nucleus dorsalis nervi vagi*, és a nyúltvelő ventrolateralis területeivel vannak kapcsolatban, és zsigeri vegetatív szabályozásban vesznek részt.

A vestibularis magkomplexum békában

Békák vestibularis magjai ugyan ma sem tökéletesen karakterizáltak, mégis az érzékszervek felőli afferenciáció és centrális kapcsolatok igen jelentékeny átfedést mutatnak magasabb rendűekével, különösen emlősökével. Hasonlóan emlősökével, a magkomplexumot négy mag alkotja, a *nucleus vestibularis superior*, *lateralis*, *medialis*, valamint a *descendens*.

Az NVS lateralis részéből, illetve az NVL és NVM rostralis részeiből eredő rostok a szemmozgató agyidegi magokba projiciálnak, kialakítva a VOR-t, a medialis és lateralis vestibulo-spinalis pályák pedig az NVL, NVM, és NVD caudalis részeiből erednek. Patkányhoz hasonlóan kiterjedt kisagyi kapcsolataik is vannak, amelyek legnagyobb valószínűséggel a vestibulo-spinalis és vestibulo-ocularis reflexek regulatorai. Laesios kísérletek emlősökéhez hasonló konklúziói indirekten alátámasztják a béka vestibularis magok funkcióinak tulajdonságainak hasonlóságát emlősökével.

AZ IDEGRENDSZER PLASZTICITÁSA, COMPENSATIO

Régóta ismert, hogy a központi idegrendszer funkcióinak hálózatai tapasztalatszerzés során folyamatos változáson mennek keresztül, ezt hívjuk plaszticitásnak. Plasztikus folyamatok végigkísérik életünket. Az ECM molekulákról is bebizonyosodott, hogy jelentős hatással vannak a synaptikus plasticitásra, s így jelentőséggel bírnak tanulási és emlékezési folyamatokban. Ebből következően a matrix molekulák turnover-e, mint az idegi kapcsolatok degradábilis stabilizálói, elősegíti a strukturális és, funkcionális plaszticitást.

A idegrendszer compensatioja számos folyamatot foglal magában, amelyek a központi idegrendszer sérülését követően zajlanak a funkció helyreállítása érdekében. Laesiot követően a szomszédos hálózatok képesek átvenni a sérült területek funkcióját. E folyamatok feltétele a synapsisok plasticus módosulása, s végül a compensatio eredményeként átalakul az érintett terület laesio előtti funkciók felosztása. A compensatio a neurológiai rehabilitáció kulcsfontosságú eszköze.

A vestibularis compensatio hátterében számos idegrendszeri mechanizmus rejlik az interneuronális kapcsolatoknak mind *presynapticus*, és *postsynapticus* elemeinek bevonásával. Mindezek alapján az egyoldali labyrinthus-sérülést követő compensációs folyamatokban változás feltételezhető az ECM molekuláris összetételében és mennyiségében.

CÉLKITŰZÉSEK

1,Ép patkány vestibularis magkomplexumában:

- Az ECM molekuláris összetételének átfogó feltérképezése a patkány vestibularis magjaiban és almagjaiban, hisztokémiai és immunhisztokémiai módszerekkel. A jelölni kívánt ECM molekulák: hyaluronsav; általános CSPG jelölés; specifikusan: aggrecan, versican, neurocan, brevican; tenascin-R; HAPLN1.
- Az egyes vestibularis magokban és almagjaiban megjelölt PNN-ek intenzitásának semiquantitatív pontozása.
- A vestibularis magokban és almagjaiban megjelölt PNN-tel körülvett neuronok Neurolucida rekonstrukciója, mennyiségi illusztrálása.

2, Egyoldali labyrinthúrtott patkány vestibularis magkomplexumában:

- A vestibularis magkomplexum egyoldali deafferenciációja, majd a postoperatív 1, 3, ill. hét 7 napos túlélési időkből a HA és CSPG jelölési mintázat, és intenzitás változásainak követése a NVL-ban.
- Megfigyeljük, hogy az egyoldali deafferenciáció miatti vestibularis tünetek rendeződésének időbeli lefolyása megegyezik-e a PNN-ek visszaépülésének idejével.

3,Ép béka vestibularis magkomplexumában:

- Az ECM molekuláris összetételének átfogó térképezése béka vestibularis magkomplexumában. Hisztokémiai és immunhisztokémiai módszerekkel kívánjuk megjelölni a HA-t, TN-R-t, általánosan CSPG-kat, valamint specifikusan az aggrecan, későbbi evolúciós összevetésekhez valamint regenerációs kísérletekhez.

ANYAG és MÓDSZER

Élő állatok kísérletbe vonása a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Biztonságának jóváhagyásával történt (Eng. szám: 11/2011/DEMÁB), illetve a vonatkozó nemzeti törvények és EU direktívák figyelembe vételével (European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC)).

ECM térképezéshez a vestibularis magkomplexumban felnőtt nőstény Wistar patkányokat (12-14 hetes; 250-300 g; n=6; Charles River Laboratory (Strain CrI: WI)), valamint kifejlett kecskebékákat (*Rana esculenta* L.; n=12) használtunk. Utóbbiak halastavi környezetből kerültek befogásra. A belsőfül egyoldali roncsolását felnőtt hím Wistar patkányokon végeztük el (n=9).

Hisztokémia

A CSPG-k általános jelöléséhez biotinylált *Wisteria floribunda* agglutinin lektint (bWFA; Sigma-Aldrich, L1516) alkalmaztunk. bWFA a CSPG-k GAG oldalláncaihoz kötődik. A HA specifikus jelöléséhez biotinylált Hyaluronan Binding Proteint alkalmaztunk (bHABP; R. Tammi és M. Tammi, University of Kuopio, Kuopio, Finnország). A bHABP borjú orrporc aggreganból hasított G1 domén HA kötő régiója.

Labyrinthusírtott patkányok NVL-án, valamint békák vestibularis magkomplexumán is a fenti hisztokémiai reakciókat alkalmaztuk.

Immunhisztokémia

ECM molekulák specifikus lokális expressziójának megfigyeléséhez a következő primer antitesteket alkalmaztuk: anti-aggrecan (Millipore, AB-1031), anti-versican (Developmental Studies Hybridomabank, DSHB, 12C5); anti-neurocan (DSHB, 1F6); anti-brevican (BD Biosciences, 610894); anti-tenascin-R (R&D Systems, AF3865); HAPLN1 (R&D, AF2608).

Békán a következő primer antitesteket alkalmaztuk: anti-CSPG clone Cat-301 (anti-aggrecan, Chemicon-Millipore, MAB 5284); és anti-tenascin-R (R&D, AF 3865).

Vizualizáció

A bHABP és bWFA primer reakciókat követően mintáinkat ExtrAvidin Peroxidase-zal inkubáltuk, majd 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) csapadékkal tettük láthatóvá hagyományos fénymikroszkópiához.

Immunhisztokémia során a metszeteket a következő sekunder szérumokban inkubáltuk: biotinylált goat anti-rabbit IgG (aggrecan, Vector Laboratories, BA-1000); biotinylált horse anti-mouse IgG (versican, neurocan, brevican, Vector Laboratories, BA-2000); biotinylált rabbit anti-goat IgG (TN-R, HAPLN1, Vector Laboratories, BA-5000). A labirintusírtott patkányok metszetein Streptavidin Alexa 488 (bHABP, Invitrogen, S32354); Streptavidin Alexa 555 (bWFA, Invitrogen, S32355) alkalmaztunk fluorescens felvételek készítéséhez.

Béka ECM térképezéséhez az alábbi fluorescens sekunder reagenseket alkalmaztuk: Streptavidin Alexa 488 (bHABP, Invitrogen, S32354); Streptavidin Alexa 555 (bWFA, Invitrogen, S32355); Alexa Fluor 647 anti-goat IgG (TN-R, Invitrogen, A21469); és Fluorescein anti-mouse IgG (Cat-301, Vector Laboratories, FI-2000).

Eredmények semikvantitatív elemzése

Patkány vestibularis magjaiban tapasztalt PNN jelölődés intenzitását szubjektív pontozással quantifikáltuk minden magban és azok almagjaiban, az összes reakció esetén külön-külön. A PNN jelintenzitásait az alábbi pontértékekkel láttuk el: -: nincs jel; +: gyenge jel; ++: közepes jel; +++: erős jel; ++++: nagyon erős jel. A versican immunreakció pontszerű megjelenése a fenti jelöléstől eltérő szimbólumok használatát indokolta.

Neurolucida rekonstrukció

A patkány vestibularis magjain és almagjain készült Neurolucida rekonstrukció mutatja be a PNN-tel körülvett neuronok elhelyezkedését és eloszlásának különbségeit az egyes magokban és almagokban. A rekonstrukcióhoz felhasznált metszetek az adott magra és reakcióra reprezentatívnak ítélt metszetekből kerültek ki, és minden vizsgált reakcióra elkészültek. Az ábrák elkészítéséhez a Neurolucida 8.0 programot használtuk.

A belső fül szervek féloldali roncsolása

A vestibularis magok egyoldali deafferenciációja legegyszerűbben a belsőfül sebészi roncsolásával valósítható meg. A feltárás legkedvezőbb iránya a ventrolateralis

megközelítés, ily módon a nyakizmok, a *nervus facialis*, *parotis* megtartható, így pedig a *bulla tympanica* is relatíve egyszerűen feltárható. A bőrt a bal fül mögött haránt irányban nyitottuk meg, majd a parotist rostral felé preparáltuk. A *musculus sternomastoideus* caudalis irányba terpesztettük, majd a fascia lemezek széttolásával láthatóvá válik a *musculus digastricus* hátsó hasa, s ez alatt már tapintható a középfül üreg, vagy *bulla tympanica*. A középfül üreg megnyitható kis malleotommal, és a nyíláson át láthatóvá válik a *promontorium*. További művelet előtt különös körütekintéssel tárjuk fel a középfület, hogy az *arteria stapedia* ép maradjon. A *promontorium* áttörésével elérjük a belső fül labirintusát, majd lándzsa hegyű eszközzel funkcióképtelenné ronsoljuk.

Az állatok ébredése után különböző vestibularis asszociált tüneteket mutatnak. Ezek lehetnek statikus tünetek (szemmozgási és testtartási zavarok), és dinamikus tünetek, a magkomplexum kiterjedt kapcsolatrendszere és commissuralis kapcsolatai miatt. A műtétet követően az állatokat 1, 3, és 7 napig hagytuk túlélni, tüneteik és viselkedésük folyamatos követésével, majd a kijelölt napokon feláldoztuk, agytörzseiket pedig paraffinba ágyasztuk szövettani feldolgozás céljából.

EREDMÉNYEK

ECM SZERVEZŐDÉSE PATKÁNY VESTIBULARIS MAGKOMPLEXUMÁBAN

Nucleus vestibularis superior

A reakciók intenzitása és mintázata erős regionális eltéréseket mutatott a NVS keresztmetszetében, viszont a mag rostrocaudalis kiterjedésében regionális különbségek nem mutatkoztak. A mag centralis részében elhelyezkedő nagy és óriás méretű neuronokat vastag PNN vette körül a reakciók mindegyikében. Legintenzívebb jelet az aggrecan és versican esetében láttunk, a HA, TN-R, WFA, és versican esetében viszont gyengülő reakció intenzitást tapasztaltunk a felsorolás sorrendjében. Leggyengébb jele neurocan és HAPLN1 esetén volt tapasztalható. Az aggrecan erősen immunreaktív, szaggatott és foltszerű lemezekben mutatkozott perisomaticusan, a neuropil felé viszont diffúz jelet adott. Az összes reakciótól merőben eltérő megjelenésű a versican morfológiai képe. A nagy és óriás méretű neuronokat folytonos perisomaticus PNN akkumulációja vette körül, illetve a soma közvetlen közelében erősen immunreaktív pontokban volt megfigyelhető.

A közepes és kis méretű neuronok körül szintén látható volt PNN, ám a nagy méretű neuronokéhoz képest változó intenzitással jelölődtek. A kis és közepes méretű neuronoknak csak kisebb csoportja körül nem volt felismerhető PNN. Ezen utóbbiak leginkább a mag perifériás területein voltak felismerhetőek.

A Neurolucida rekonstrukció ábrázolja, hogy a mag centralis részében helyezkedtek el a PNN-et halmozó nagy és óriás méretű neuronok.

Nucleus vestibularis lateralis

A NVS-ban tapasztalt regionális különbségekkel ellentétesen a NVL-ban regionális szétválás nem volt tapasztalható a reakciók mintázatában a mag keresztmetszeti és rostrocaudalis kiterjedésében. A mag különösen nagy számban tartalmaz nagy és óriás méretű neuronokat, amelyek körül jellemzően PNN halmozódás volt látható, ám a közepes és kisméretű sejtek esetében változó számban volt jelen vagy hiányzott a PNN. A legerősebb reakciókat az anti-aggrecan és anti-brevican reakciók mutatták, míg a HA, TN-

R, WFA és neurocan kevésbé intenzíven jelölődött, és leggyengébben a HAPLN1 volt kimutatható a PNN-ben. A versican reakció, a NVS-ban tapasztaltakhoz képest, eltérő mintázatot produkált, mivel perisomaticusan nem alkotott kontinuos gyűrűszerű megjelenést, csak erősen immunreaktív, ám különálló pontszerű halmozódásokat.

A NVL Neurolucida képén is látható a nagy és óriás méretű neuronok egyenletes elhelyezkedése a mag teljes keresztmetszetében.

Nucleus vestibularis medialis

A NVM két jól elkülönülő neuroncsoportra osztható, a periventricularisan elhelyezkedő parvocellularis (NVM PC), valamint tőle ventrolateralisan elhelyezkedő magnocellularis subpopulációkra (NVM MC).

A magnocellularis rész nagyrészt közepes és nagy méretű neuronokat tartalmaz, amelyeket jellemzően PNN vesz körül. Legerősebb jelölést a HA, aggrecan, brevican, és a TN-R reakcióival láttuk. Kevésbé intenzív jelet eredményezett a WFA és neurocan kimutatása, és leggyengébbnek a HAPLN1 reakció mutatkozott. Ahogyan az NVS-ban, az NVM-ban is az aggrecan szaggatottan megjelenő erősen immunreaktív foltokban volt látható perisomaticusan. A versican az eddigiekben is tapasztalt pontszerű halmozódásokat mutatta, perisomaticusan és neuropilben.

A NVM parvocellularis részében kis méretű neuronok vannak jelen legnagyobb számban, illetve igen kevés közepes méretű neuron. PNN-et csak alacsony számban láthattunk, főleg a közepes méretű sejteknél, legerősebb jellel a HA és TN-R esetében. Igen alacsony számú PNN-t fedeztünk fel az aggrecan, brevican és WFA reakcióival, a neurocan és HAPLN1 esetében pedig egyáltalán nem tapasztaltunk jelet PNN-ben.

A Neurolucida rekonstrukció ábrázolja a magnocellularis és parvocellularis divíziók közötti markáns különbségek PNN-ek számában, elhelyezkedésében, illetve a reakciók közötti eltéréseket.

Nucleus vestibularis descendens

Rostrocaudalis kiterjedésében a NVD két jól elkülönülő almagra osztható. A rostralis részben nagy számban fordulnak elő közepes, nagy és óriás méretű neuronok, melyeket

jellemzően PNN vesz körül. A WFA és aggrecan mutatta ki a legerősebb expressziót, amelyet a TN-R követett, leggyengébb jelet pedig HA, neurocan, és HAPLN1 reakciói mutatták. A versican ugyan pontszerű megjelenésű, ám a NVS, NVL, és NVM-hoz képest jóval gyengébb jelölődést mutatott. Az összes reakció közül a brevican mutatkozott leggyengébbnek, tulajdonképpen nem mutatott expressziót. A kisméretű neuronok körül nem, vagy csak elvétve tapasztaltunk PNN-t kizárólag WFA, aggrecan, és TN-R reakciókkal.

A mag caudalis részében igen eltérő molekuláris expressziót és mintázatot tapasztaltunk, amit a hosszanti axonkötegek s kisebb sejtméretek eredményeznek. A rostralis részhez viszonyítva a jelek általában gyengébbek a mag caudalis részében. Legintenzívebbnek a HA, WFA, versican, és TN-R bizonyult. PNN-t csak elvétve láttunk kizárólag versican és TN-R esetében, és gyenge jelintenzitással. Más reakciók esetében nem volt látható immunreakció a mag caudalis részében.

Megfigyeléseinket a Neurolucida ábrázolás is alátámasztja.

A PNN-ek immunhisztokémiai jelölődésének intenzitását semiquantitatív módon értékeltük ki, és táblázatos formában összegeztük. A szubjektív pontozás is alátámasztja a morfológiai adatainkat, miszerint a vestibularis stimulus gyors válaszreakcióiért felelős nagyméretű neuronokat erős PNN veszi körül, míg a commissuralis és gerincvelői kapcsolatokat fenntartó, illetve szemmozgás és vegetatív funkció tónusos szabályozásáért felelős közepes vagy kis neuronok somáit elvétve vagy egyáltalán nem borította PNN.

PNN

MINTÁZATÁNAKVÁLTOZÁSAIPATKÁNYNUCLEUSVESTIBULARISLATERALISÁBANEGYOLDALILABYRINTHUSIRTÁSTKÖVETŐEN

Az **első** postoperatív napon az NVL nagy méretű neuronjai körül jellemző HA jelölés jelentősen gyengül a PNN-ben az operált oldalon, míg az ép oldali NVL-ban nem volt változás észlelhető. A **harmadik** postoperatív napon tovább csökkent a HA jelölődése a PNN-ben az operált oldalon, sőt egyes esetekben nem ábrázolódtott felismerhető PNN sem, míg ép oldali mintázat nem különbözött az előző túlélési időtől. A **hetedik** túlélési napra újra megjelent a HA jelölődése a műtött oldali neuronok PNN-ében, de a kontroll szinttől

még elmaradt. A neuropilben emelkedett HA expressziót láttunk a harmadik és hetedik postoperatív napokon.

A CSPG-k átlános jelölése a NVL PNN-eiben bWFA lektinnel jelentős intenzitásbeli csökkenést jelzett az operált oldali magban, amely a CSPG-k jelentős perineuronális csökkenésére utal. Ép oldalon a PNN-k megtartottak.

Az **első** postoperatív napon már látható volt a PNN-ekben a CSPG-k jelentős csökkenése, míg az ép oldalon nem tapasztaltunk hasonló változást. A **harmadik** túlélési napon az operált oldalon a PNN-ben nem tapasztaltunk eltérést az első naphoz képest. A hetedik napra viszont enyhe erősödést tapasztaltunk a PNN-ek jelintenzitásában, arra engedve következtetni, hogy CSPG-k reakkumulálódnak perineuronálisan. A neuropil jelerőssége is hasonló dinamika szerint alakult.

ECM SZERVEZŐDÉSE BÉKA VESTIBULARIS MAGKOMPLEXUMÁBAN

Nucleus vestibularis superior

A HA próba csak gyenge vagy közepes jelölődést eredményezett a NVS-ban. PNN nem ábrázolódt, csak szaggatott szakaszokban látszódt halmazódás a perikaryonok környezetében. A TN-R immunreakció tökéletesen negatívnak bizonyult, perineuronálisan és a neuropilben is. A WFA jelölés esetében sem láthatóak PNN-k, sőt a neuropilben is elvétve látható jel. Somáktól távol, a neuropilben kerek vagy ovoid, intenzíven jelölt struktúrák jelölődtek kizárólag, amelyek átmérője 1,5-17 μm , ami legnagyobb valószínűséggel a nodalis ECM. Hasonló mintázat mutatkozott a Cat-301 antitest esetében is. A PNN-ek hiánya és a gyűrű vagy pontszerű nodalis struktúrák mellett cytoplasmaticus immunreaktív granulumok is felismerhetők.

Nucleus vestibularis lateralis

Az összes vestibularis mag közül a NVL-ban mutatkozott legintenzívebbnek a HA reakciója. A legerősebb PNN a NVL-nam mutatkozott, amely csak HA reakcióval ábrázolódt. A TN-R reakció is intenzív volt, és perisomatcus halmazódása is látható, ám folytonos PNN-t nem jelölt ki. A CSPG általános jelölése nem ábrázolt PNN-t, meglepő módon, viszont a neuropilben már említett nodalis matrix NVL-ban is látható volt. Az anti-

aggrecan reakció sem mutatott körülírt PNN-t, viszont hasonlóan az NVS-hoz, intenzív cytoplasmaticus granulumokat jelölt.

Nucleus vestibularis medialis

A HA jelölt ki összefüggő PNN-et, amely jól elkülönült a környező neuropiltól. A reakció intenzitása alulmaradt a NVL-ban látotthoz képest, de **kijelenthető hogy PNN csak bHABP-val mutatkozott a NVL-ban és NVM-ban.**A TN-R reakciója nem volt pozitív perineuronális neuropilben, vagy nodalisban. A bWFA jel csakis a neuropilben látható, feltehetően a nodalis, matrixot mutatta ki. Az anti-aggrecan antitest is kizárólag nodalis matrixfeltételezett ovoid mintázatát jelölte, a NVM-ban cytoplasmaticus granulumokat nem jelölt.

Nucleus vestibularis descendens

A bHABP nem mutatott ki PNN-et a NVD-ben, csupán a neuropilben volt látható diffúz jel. A TN-R nagyon gyenge vagy negatív volt, sem perisomaticusan, sem a neuropilben nem ábrázolt struktúrákat. A WFA esetében sem jelentek meg PNN-ek, illetve a Ranvier féle befűződésekben sejtett jelek is halványan jelentek meg. A Cat-301 esetében pedig elvértve és kevés számban láttunk cytoplasmaticus granulumokat, PNN-t viszont nem jelölt meg.

DISZKUSSZIÓ

AZ EXTRACELLULARIS MATRIX SZERVEZŐDÉSE ÉS SZEREPE A PATKÁNY VESTIBULARIS MAGKOMPLEXUMÁBAN

Nucleus vestibularis superior

A NVS-ban a perineuronális hálók kialakulása a neuronok méretével mutat összefüggést. Mindez annak lehet magyarázata, hogy a **mag funkcionálisan eltérő régióiban megtalálható neuronjai körül a PNN különböző festési mintázatot mutat.**

Az NVS nagyméretű neuronjai inhibitoros kapcsolatban állnak a *nucleus nervi oculomotorii* és *trochlearis* neuronaival az ipsilaterális *fasciculus longitudinalis medialis*-onkeresztül; neurotransmittereik pedig a glycín (horizontális tekintés), és GABA (vertikális tekintés). A közepes- és kis méretű neuronok körül, amelyek a mag perifériáján vannak, csak egy-egy esetben láttunk PNN-et, a legtöbb neuron esetében pedig hiányzott. Az NVS nagy- és óriás méretű neuronjai a gyors reakciójú VOR kialakításában játszanak elsőrendű szerepet, míg a közepes-, és kisméretű neuronok az extraocularis izmok tónusos szabályozásán keresztül a tekintet fixálását végzik, illetve commissuralis kapcsolatban vannak a contralaterális NVS-ral.

Nucleus vestibularis lateralis

A NVL-t alkotják legnagyobb számban a nagy- és óriás méretű neuronok, míg elszórtan helyezkednek el kisebb számban a közepes méretűek, ám jóval alacsonyabb számban. Nem tapasztalható eltérés a neuronok méretbeli megoszlásában a mag teljes terjedelmét tekintve, a rostrális és caudális részek funkciók eltérései ellenére. **A mag nagy- és óriás neuronjait igen erős PNN veszi körül kivétel nélkül, míg a NVS-ban tapasztaltakhoz hasonlóan, a közepes- és kis méretű neuronok körül egy-egy esetben volt PNN felismerhető.**

A NVL rostrális része szemmozgások koordinációjában vesz részt, míg caudális része spinalis kapcsolatokkal rendelkezik, ám az eltérő funkciók, kapcsolattrendszerei, és neurokémiai tulajdonságai ellenére nem tapasztaltunk eltérést az ECM mintázatában illetve PNN-ek gyakoriságában a mag rostrocaudális kiterjedésében. Ennek ECM molekulákra vonatkoztatott magyarázata eddig tisztázatlan.

Nucleus vestibularis medialis

A NVM almagjaiban megfigyelhető PNN-ek megjelenése, száma, molekuláris mintázata jellemző eloszlást mutatott. **PNN-ek ezen regionális megjelenése feltételezésünk szerint összefüggésben áll a neuronok morfológiájával és kapcsolatrendszerével.** Minden vizsgált reakció esetében PNN felismerehető volt a ventrolateralisan elhelyezkedő magnocellularis almag neuronjai körül, míg a parvocellularis almagban alig fodrult elő felismerhető PNN. A NVM neuronjai morfológiai, hodológiai, így fiziológiai szempontból is nagyon különböző neuroncsoportokra oszthatók. Közel egybehangzóan, egér, patkány és tengerimalac NVM-ában két fő neuroncsoport határozható meg. Az ún. 'type B' neuronokat jellemzően PNN borítja, így a csoport a magnocelluláris divízióval azonosítható, viszont a 'type A' szubpopulációban elvétele ismerhető fel ECM halmozás, s a parvocelluláris populációra utaló jegyeket mutatják, gerincvelői, kisagyi és vegetatív kapcsolatrendszerrel. A magnocellularis divízió neuronai glutamatergek vagy glicinergek, és a VOR, illetve vestibulo-spinalis pályákat alakítják ki.

Eredményeinket összevetve a fellelhető irodalmi adatokkal, **megállapítottuk, hogy a NVM magnocellularis részében elhelyezkedő közepes és nagyméretű neuronokat karakterisztikusan PNN borítja, míg a parvocellularis almag neuronjainak csak igen kis aránya körül látható PNN, nagyrészt azonban hiányzik,** és reakciók intenzitása is általánosan alacsonyabb.

Nucleus vestibularis descendens

A mag morfológiailag jól elkülöníthető rostralis és caudalis részekre osztható, és ugyanez a megoszlás felismerhető volt az összes vizsgált reakciónk esetében is. Az igen jellemző rostrocaudalis lefutású rostátmetszetek nem minden reakció estében voltak felismerhetőek, valószínűleg az egyes ECM alkotók localis expresszió különbségei miatt.

A rostralis részben számos nagy és óriás méretű neuron van, és a NVL hasonló méretű sejtjeivel azonos funkciót, testtartás és egyensúly szabályozását végzik, illetve fejmozgások koordinálásában vesznek részt kiterjedt spinális és oculomotoros kapcsolatokkal. **A neuronok e mérettartományára jellemző PNN formációk jelen voltak, kisebb neuronátmérők esetén pedig csak elvétele volt ugyanez tapasztalható.**

A NVD caudalis részében általánosan igen gyenge immunjelölést tapasztaltunk. A magot alkotó közepes- és kisméretű neuronok nyúltvelői vegetatív magokkal állnak kapcsolatban, a vestibularis stimulusokra adott cardiovascularis, respiraticus, és gastrointestinalis válaszokért felelősek. A sejttesteket nem borította perineuronális ECM akkumuláció, és ez egybeesik a vestibularis magkomplexum más részein tapasztaltakkal, illetve irodalmi utalásokkal.

FÉLOLDALI LABYRINTHUS IRTÁS A HYALURONSAV ÉS KONDOITIN SZULFÁT PROTEOGLIKÁNOK ÁTMENETI CSÖKKENÉSÉT OKOZZA PATKÁNY NUCLEUS VESTIBULARIS LATERALISÁBAN

Megfigyeléseink azt igazolják, hogy a labyrinthus irtás tüneti rendeződésének időbeli lefolyása szorosanköveti a PNN-ek újraépülését, így valószínűsíthető a HA és kondroitin szulfát proteoglikánok szerepe a vestibularis compensatio során. További eredményeink is az mutatják, hogy a lecticanok mennyisége egyenként is jelentősen változik a compenstaious folyamat során, s alátámasztják a WFA jelölés, mint általános CSPG marker, eredményeit.

Axonnövekedés és új hálózati kapcsolatok kialakulása ugyan nem zajlik a postoperatív időszakban, viszont a kétoldali vestibularis magok közötti működési egyensúly felborulása a synapticus transzmisszió hatékonyságának radikális változását váltja ki a compensatio folyamatok lefolyása során. **Az intracellularis eseményekkel párhuzamosan az ECM is változik, ami tapasztalható a PNN-ek HA és WFA jelölésének intenzitás csökkenésében.** A vestibularis hálózat működési egyensúlya a neuronok nyugalmi membránpotenciáljának visszaállásával valósul meg, amihez szükséges synapticus elemek szerkezetei „fellazítása”, hogy új fiziológiai egyensúly eléréséhez morfológiai transzformáció mehesse keresztül. **Synapsisok plasticus transzformációi két, idegrendszerben szorosan összefüggő téren, zajlanak le: (i) synapticus plasticitás során aktivitás függő módon változik a synapticus transzmisszió hatékonysága, viszont ez megkívánja (ii) a synapsisok anatómiai, vagy strukturális plasticitását, azaz meglévő synapsisok morfológiai változását.**

A ECM makromolekulák turnover-e szinkronban van az általunk látottakkal. A szulfatált GAG-ok turnover-e az agyban megközelítőleg 24 óra. Lebontásukat a gyorsan aktiválódó mátrix metalloproteinázok és szintetizáló enzimek aktivitásának gyors csökkenése okozza. Hasonlóképpen a HA feleződése egy, vagy néhány nap leforgásával lezajlik, s ez is szinkronban van az általunk látott eredményekkel féloldali labirintusirtás után.

A NVL nagy számban vannak jelen az ún. Held féle calyx óriás méretű synapsisai. A *corpus trapezoideumban* lévő calyxokat aggregan veszi körbe, míg a synapticus résben brevicant mutattak ki. Ez az elrendeződés valószínűleg a vestibularismagokban is ugyanúgy jelen van. Mindezek alapján **feltételezhető, hogy a proteglycanok jelentős arányát kitevő perisynapticus akkumulációk változásai állnak eredményeink háttérben.**

A PERINEURONALIS HÁLÓKATELSŐSORBAN HYALURONSAV ALKOTJA ABÉKA VESTIBULAIRS MAGKOMPLEXUMÁBAN

A filogenetikusan alacsonyabb kétéltűek vestibularis magjaiban jelentős különbséget feltételeztünk a ECM, különösen a PNN-ek, molekuláris összetételét illetően.

A jelen munka ezidáig az első, amely béka vestibularis magkomplexumában írta le az ECM molekuláris szerveződését. Ezen eredmények felhasználásával lehetővé válik különböző fajok vestibularis magjainak összehasonlítása evolúciós perspektívában. Eredményeink közül külön kiemelő, hogy **a béka vestibularis magkomplexumában csak a NVL és NVM nagyméretű neuronaji körül volt megfigyelhető a PNN, amelyben csak HA jel ábrázolódott.** Chondroitin sulfatok, TN-R, és HAPLN1 link protein jeleit nem láttunk immunhisztokémiai mintáinkon, több különböző epitóra termelt antitest felhasználásával azonos ECM molekulákra is, kivéve a NVL-ban enyhe TN-R halmozást periszomatikusan. **Ezen eredmények élesen különböznek a patkány vestibularis magjaiban tapasztaltakkal, ahol CSPG, TN-R, valamint HAPLN1 jelen volt.** Patkányban látottakkal egybehangzóan viszont az ECM mintázata és molekuláinak expressziója regionális megjelenést mutat, élesen különbözik az egyes magokban, **amely felveti okként a funkcionális különbözőségeket** illetve egyes magok *rhombomer* specifikus eredetét. Ismert, hogy kétéltűek központi idegrendszere képes regenerációra emlőskével ellentétben, illetve jellemzi magas fokú plaszticitás, ezek elméleti háttére

azonban jelenleg tisztázásra szorul. Jelen eredményeink szerint ezen egyedi ECM összetétel lehet az egyik lehetséges magyarázat.

HA-at jelentősen halmozó PNN-ek a NVL-ban és NVM-ban alátámasztani látszanak korábbi eredményeinket, miszerint a sérült vestibularis funkciót helyreállító compensatio folyamatok elsősorban e két magot érintik, amit kiterjedt kapcsolatrendszerük is jelez. A *nervus vestibulocochlearis* átvágását követően békában nemcsak compensatio zajlik. **A HA-t jelentősen halmozó milió promotálja az anatómiai regenerációt**, rostok újránövését a ganglion vestibulare felől, reinnervációt és neurogenezist, **valamint új synapticus kapcsolatok kialakítását.**

ÖSSZEFOGLALÁS

Jelen munka az első morfológiai összefoglalás, amely az extracellularis matrix (ECM) molekuláris összetételének vizsgálatát és eloszlásának feltérképezést tűzte ki célul a vestibularis magkomplexumban. Vizsgálatainkat ép és labirintus irtott patkányokon, valamint ép kecskebékákön (*Rana esculenta*) végeztük.

Eredményeink alapján a legfontosabb következtetéseink:

- Patkány vestibularis magkomplexumában az ECM molekulák regionális megoszlást mutatnak. Az ECM valamennyi ismert megjelenési formáit leírtuk a patkány vestibularis magjaiban: diffúzan a neuropilben, és kondenzált formában, mint 'perineuronális net' (PNN) és ún. 'axonal coat', ill. nodalis ECM a Ranvier féle befűződések körül.
- A PNN kialakulása neuron mérettől függő, az óriás- és nagyméretű neuronokat erős PNN veszi körül, míg a közepes- és kisméretű neuronok körül nagyrészt nem alakul ki PNN.
- Jelentős különbségek mutatkoztak a neuropil és PNN-ek jelölődési mintázatában a vestibularis magkomplexum különböző afferens és efferens kapcsolatokkal és funkcióval rendelkező régiói között.
- Patkányban féloldali labirintusirtást követően a hyaluronsav és chondroitin sulfat proteoglycanok jelölődésének jelentős csökkenését tapasztaltuk a sérült oldali *nucleus vestibularis lateralis* neuronjait borító PNN-ben.
- Labirintus irtását követő tünetek rendeződésének időbeli lefolyása megfelel a perineuronális hálók újbóli kiépülésének idejével, amiből következtethetünk az ECM turnover szerepére az idegrendszer plasztikus változásaiban, és vestibularis tünetek kompenzálódásában.
- Béka vestibularis magkomplexumában kizárólag a laterális és medialis magokban jellemző a PNN. Felépítésükben csak a hyaluronsav vesz részt, viszont chondroitin sulfat proteoglycanok nincsenek jelen. Ezen ECM összetétel magyarázhatja a béka vestibularis rendszer nagyfokú plaszticitási és regenerációs képességeit/lehetőségeit.
- Béka vestibularis magkomplexumában, patkányhoz hasonlóan, karakterisztikus regionális különbségek láthatóak az ECM molekuláris összetételét és a jelölődés mintázatát tekintve, amely összefüggésbe hozható az területek funkcionális és kapcsolati jellemzőivel.

PUBLIKÁCIÓK



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



Iktatószám: DEENKÉTK/245/2014.
Tételszám:
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Gaál Botond Ágoston
Neptun kód: SNBEKV
Doktori Iskola: Fogorvostudományi Doktori Iskola
Mmt azonosító: 10037882

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Gaál, B., Rácz, É., Juhász, T., Holló, K., Matesz, C.: Distribution of extracellular matrix macromolecules in the vestibular nuclei and cerebellum of the frog, *Rana esculenta*. *Neuroscience*. 258, 162-173, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.10.080>
IF:3.327 (2013)
2. Rácz, É., Gaál, B., Kecskés, S., Matesz, C.: Molecular composition of extracellular matrix in the vestibular nuclei of the rat. *Brain Struct. Funct.* 219 (4), 1385-1403, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00429-013-0575-x>
IF:4.567 (2013)
3. Deák, Á., Bácskai, T., Gaál, B., Rácz, É., Matesz, K.: Effect of unilateral labyrinthectomy on the molecular composition of perineuronal nets in the lateral vestibular nucleus of the rat. *Neurosci. Lett.* 513 (1), 1-5, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2012.01.076>
IF:2.026

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 9,92

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 9,92

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

Debrecen, 2014.09.09.

Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. • Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 45. • Tel.: (52) 518-600
E-mail: publikaciok@lib.unideb.hu • Honlap: lib.unideb.hu

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A jelen téziseket megalapozó tudományos munka a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Anatómiai, Szövet-, és Fejlődéstani Intézetében készült. Mint környezetgazdálkodási agrármérnöknek, különösen nagy kiváltság, hogy orvostudományi területen szerezhettem meg PhD fokozatomat. A lehetőségért és munkám során kapott számos segítségért szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik hozzájárultak az értekezés eredményeihez.

Szeretném hálámat kifejezni témavezetőmnek, Dr. Matesz Klára professzor asszonynak a véget nem érő támogatásáért tudományos és személyes téren egyaránt. A Matesz laboratórium családias légköre biztosította minden napon a munka elkészítéséhez szükséges motivációt.

Külön köszönetet szeretnék mondani Dr. Antal Miklós professzor úrnak, hogy lehetőséget adott számomra a tudományos munkában és oktatásban való részvételre. A számtalan hisztotechnikai, immunhisztokémiai segítségért, illetve személyes barátságáért és bizalmáért megkülönböztetett köszönet illeti Dr. Módis László professzor urat.

Nagy hálával tartozom Dr. Mészár Zoltán adjunktusnak és Dr. Rácz Éva tanársegédnek a szövettani preparátumok, immunhisztokémia, mikrosebészeti beavatkozások, biokémiai módszerek, képelemzés és szerkesztés és tudományos beszélgetések terén nyújtott segítségüket. A munkán kívül is barátság alakult ki közöttünk.

A technikai segítségnyújtást szeretném megköszönni Horváth Tímea szakasszisztensnek. A kutatói munkám első lépéseiben sok segítséget nyújtott Gregori Erzsébet, Dr. Bácskai Tímea, és Dr. Deák Ádám, és jelenlegi munkatársaim, Kecskés Szilvia PhD hallgató, Dr. Birinyi András docens, és Dr. Juhász Tamás adjunktus. Segítségüket ezúton köszönöm meg.

Utolsóként pedig szeretnék külön köszönetet mondani szüleimnek, Dr. Gaál Botond egyetemi tanárnak, és Dr. Czeglédy Mária gyermekfegszakorvosnak a sok szeretetért és támogatásért tanulmányaim és munkám során.

TÁMOGATÁSOK

MTA-TKI 11008

MTA-TKI 255

OTKA Bridging Fund

OTKA K 67 64 1

TÁMOP-4.2.4B/2-11/1-2012-0001 Campus Hungary

TÁMOP 4.2.2/B-10/1-2010-0024 Doktorjelölti Ösztöndíj

A kutatás a **TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001** Nemzeti Kiválóság Program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.



Nemzeti
Kiválóság
Program