

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**A tenascin-R és brevican szerepe az egyensúlyozó rendszer sérülését követő  
kompenzációs folyamatokban**

Dr. Magyar Ágnes

Témavezető: Dr. Gaál Botond



DEBRECENI EGYETEM  
Fogorvostudományi Doktori Iskola

Debrecen, 2024

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>1. BEVEZETÉS</b>	<b>5</b>
<b>2. A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI, A TERVEZETT VIZSGÁLATOK IRODALMI HÁTTERE</b>	<b>5</b>
<b>2.1 A vestibularis rendszer agytörzsi apparátusa</b>	<b>7</b>
<b>2.2 A vestibularis magkomplexum afferens és efferens kapcsolatai</b>	<b>10</b>
2.2.A Afferens kapcsolatok:	10
2.2.B Efferens kapcsolatok:	11
<b>2.3 Extracellularis matrix a központi idegrendszerben</b>	<b>12</b>
2.3.1 Hyaluronsav	12
2.3.2 Proteoglycanok	13
2.3.2.1 Chondroitin-sulfat proteoglycanok	15
2.3.3 Glycoproteinek az extracellularis matrixban	18
2.3.4 Kötőfehérjék: Hyaluronan and Proteoglycan Link Protein (HAPLN)	18
2.3.5 Tenascin	19
<b>2.4 ECM szerveződési formái a központi idegrendszerben</b>	<b>21</b>
<b>2.5 Synapticus plaszticitás</b>	<b>22</b>
<b>2.6 Vestibularis kompenzáció</b>	<b>24</b>
<b>3. CÉLKITŰZÉSEK</b>	<b>26</b>
<b>4. ANYAGOK és MÓDSZEREK</b>	<b>28</b>
<b>4.1 Etikai jóváhagyás</b>	<b>28</b>
<b>4.2 Kísérleti állatok</b>	<b>28</b>
<b>4.3 Unilateralis labyrinthus laesio és szövettani feldolgozás</b>	<b>28</b>
<b>4.4 Immunhisztokémia</b>	<b>30</b>
4.4.1 Tenascin-R immunhisztokémiai kimutatása	31
4.4.2 Brevican immunhisztokémiai kimutatása	31
<b>4.5 Tenascin-R expresszió változásnak szemikvantitatív értékelése, statisztikai elemzése</b>	<b>32</b>
<b>4.6 A brevican expresszió változásának kvantitatív elemzése és statisztikai értékelése</b>	<b>33</b>
<b>4.7 Perineuronális hálók mennyiségi meghatározása</b>	<b>34</b>
<b>4.8 A brevican expresszió változásának statisztikai elemzése</b>	<b>34</b>
<b>5. EREDMÉNYEK</b>	<b>35</b>
<b>5.1 Egyoldali labyrinthus laesio következményeként a Tenascin-R expresszió átmentileg lecsökken a vestibularis magkomplexum perineuronális hálóiiban és neuropilében</b>	<b>35</b>
5.1.1 Nucleus vestibularis superior	36
5.1.3 Nucleus vestibularis lateralis	38
5.1.4 Nucleus vestibularis descendens	38
<b>5.2 Tenascin-R szemikvantitatív intenzitásértékeinek statisztikai analízise</b>	<b>40</b>
<b>5.3 Labyrinthus laesio következményeként a NVS perineuronális hálói tranziens morfológiai változást mutatnak</b>	<b>41</b>

<b>5.4</b>	<b>Labyrinthus laesio hatása a perineuronális hálóval fedett neuronok részarányára a NVS-ban</b>	<b>41</b>
<b>5.5</b>	<b>UL-t követően átmenetileg megváltozott a brevican-pozitív perineuronális hálók részaránya az erős-közepes-gyenge osztályok között.</b>	<b>43</b>
<b>5.6</b>	<b>Labyrinthus laesio hatása a brevican-pozitív perineuronális hálók átlagos optikai denzitás értékeire a nucleus vestibularis superiorban.</b>	<b>45</b>
<b>6.</b>	<b>MEGBESZÉLÉS</b>	<b>48</b>
<b>6.1</b>	<b>Eredményeink rövid összefoglalása</b>	<b>48</b>
<b>6.2</b>	<b>A tenascin-R vélhető szerepe vestibularis kompenzációban</b>	<b>49</b>
<b>6.3</b>	<b>A brevican vélhető szerepe vestibularis kompenzációban</b>	<b>51</b>
<b>6.4</b>	<b>A PNN átmenetileg változik kompenzáció során</b>	<b>53</b>
<b>6.5</b>	<b>Synapticus plaszticitás subcellularis eseményei</b>	<b>55</b>
<b>6.6</b>	<b>Synapticus plaszticitás extracellularis eseményei</b>	<b>57</b>
<b>7.</b>	<b>IRODALOMJEGYZÉK</b>	<b>59</b>
<b>8.</b>	<b>ÖSSZEFOGLALÁS</b>	<b>68</b>
<b>9.</b>	<b>SAJÁT KÖZLEMÉNYEK</b>	<b>71</b>
<b>10.</b>	<b>TÁRGYSZAVAK</b>	<b>73</b>
<b>11.</b>	<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b>	<b>74</b>
<b>12.</b>	<b>FÜGGELÉK</b>	<b>75</b>

## LEGGYAKRABBAN HASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

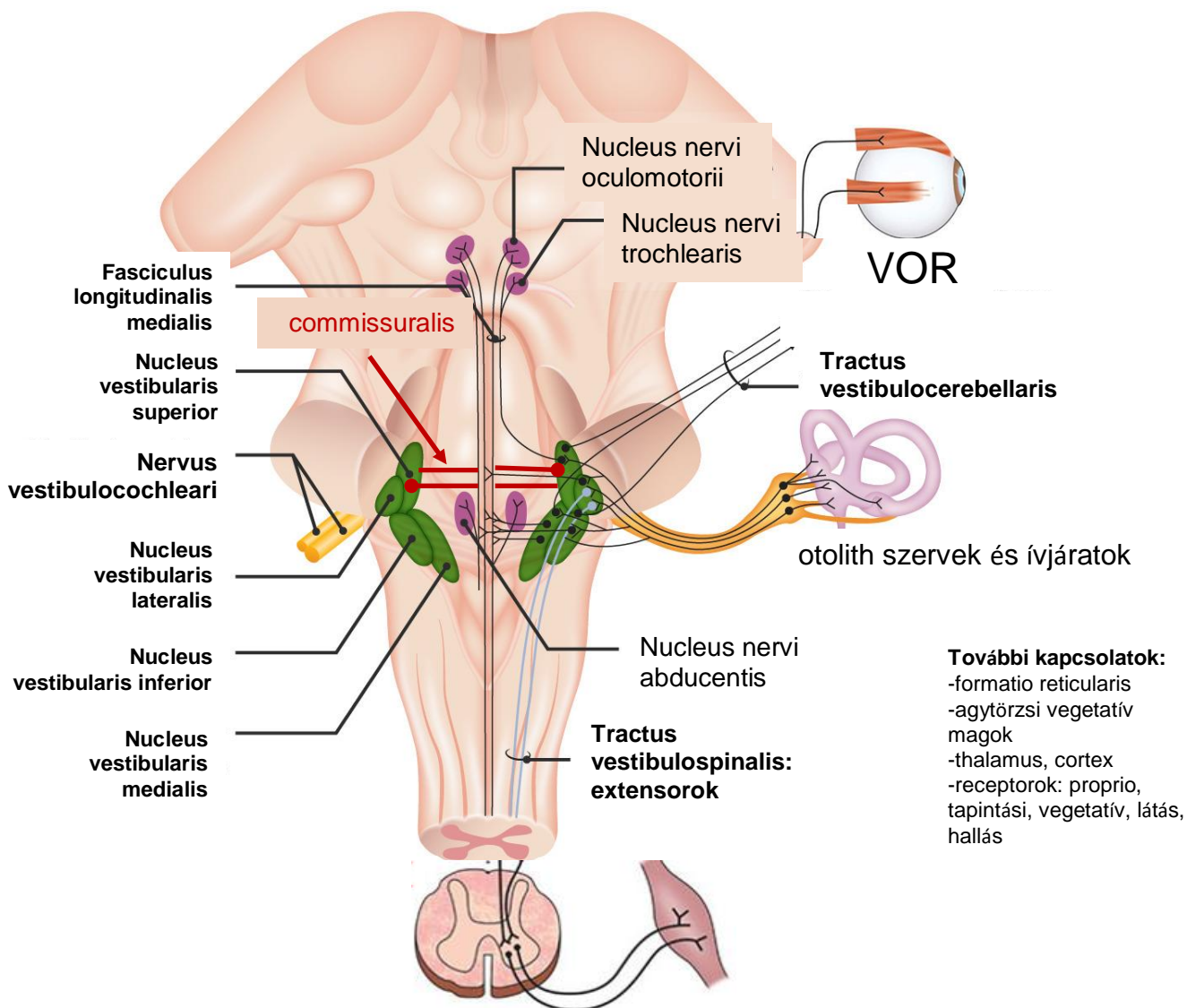
<b>AC</b>	<b>axonal coat (axonok preterminalis szakaszát borító ECM)</b>
<b>AMPA</b>	<b><math>\alpha</math>-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</b>
<b>BSA</b>	<b>bovine serum albumin (borjú szérum albumin)</b>
<b>CSPG</b>	<b>chondroitin-sulfat proteoglycan</b>
<b>EC</b>	<b>extracellularis</b>
<b>ECM</b>	<b>extracellularis matrix</b>
<b>GAG</b>	<b>glükózaminoglycan</b>
<b>HA</b>	<b>hyaluronsav (hyaluronan)</b>
<b>HAPLN1</b>	<b>Hyaluronan and Proteoglycan Link Protein 1</b>
<b>KIR</b>	<b>központi idegrendszer</b>
<b>LTD</b>	<b>long term depression</b>
<b>LTP</b>	<b>long term potentiation</b>
<b>MMP9</b>	<b>matrix metalloproteáz 9</b>
<b>NMDA</b>	<b>N-methyl-D-aspartate</b>
<b>NVD</b>	<b>nucleus vestibularis descendens</b>
<b>NVL</b>	<b>nucleus vestibularis lateralis</b>
<b>NVM</b>	<b>nucleus vestibularis medialis</b>
<b>NVM MC</b>	<b>nucleus vestibularis medialis magnocellularis osztata</b>
<b>NVM PC</b>	<b>nucleus vestibularis medialis parvocellularis osztata</b>
<b>NVS</b>	<b>nucleus vestibularis superior</b>
<b>PBS</b>	<b>foszfát puffer fiziológias sóoldata</b>
<b>PNN</b>	<b>perineuronális háló</b>
<b>TN-R</b>	<b>tenascin-R</b>
<b>UL</b>	<b>unilateralis labyrinthus laesio (egyoldali belsőfülsérülés)</b>
<b>WFA</b>	<b><i>Wisteria floribunda</i> agglutinin lectin</b>

# 1. BEVEZETÉS

A központi idegrendszeri (KIR) neuronhálózatok reorganizációjában számos fiziológiai és pathofiziológiai hatás közrejátszik. E komplex folyamat intra- és extracellularis események egymást feltételező sorozata, melyben, laborunk munkatársai és más kutatók megfigyelései szerint, az extracellularis matrix (ECM) is meghatározó szereplő. A plasztikus változások végső eredménye pedig az adott neuronhálózat új egyensúly szerinti működése. Szintén az elmúlt évtizedben ismerték fel, hogy az ECM átépülése nem tekinthető egységesnek a KIR morfológiailag, így funkcionálisan is eltérő részein. A kiváltó ok és annak kiterjedése is nagyon meghatározó, amely alapvetően meghatározza a károsodott funkció visszatérésének mértékét, lehetőségét. Ismert, hogy az embryonalis idegszövet nagyfokú plaszticitással rendelkezik, felnőttkorig azonban ez a képessége fokozatosan beszűkül (Carulli D et al., 2006; Galtrey CM and Fawcett JW, 2007). Számos kísérleti megfigyelés szól amellett, hogy a KIR sérülését követő plaszticitás feltételezhetően érinti a synapticus morfológiát, sejt felszíni receptor expressziót, neurotranszmitter ürülést és diffúziót, ám mindezek mechanizmusa és dinamikája ma még csak részben ismert (Oohashi T et al., 2015).

## 2. A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI, A TERVEZETT VIZSGÁLATOK IRODALMI HÁTTERE

Humán vonatkozásban a vestibularis laesiok, például a Menière betegség, a vestibularis rendszer érzékszerveit érintő primer és szekunder sérülések, vagy ototoxicus gyógyszerkezelés után kialakuló vestibularis tünetek az idő előrehaladtával legtöbbször csökkennek vagy eltűnnek. A vestibularis rendszer filogenetikailag konzervatív felépítése (**1. ábra**) alkalmassá teszi, hogy *in vivo* állatkísérletes modellek vizsgálataiból a humán plaszticitási folyamatokkal is párhuzamot vonjunk (Deak A et al., 2012; Faralli A et al., 2016; Gaal B et al., 2015).



**1. ábra** Az egyensúlyozó szervrendszer legfontosabb afferens és efferens kapcsolatai. **VOR:** vestibulo-ocularis reflex. **Forrás:** módosítva Rajan Devesahayam, Prepageran Narayanan – Vertigo: Clinical Practice and Examination.

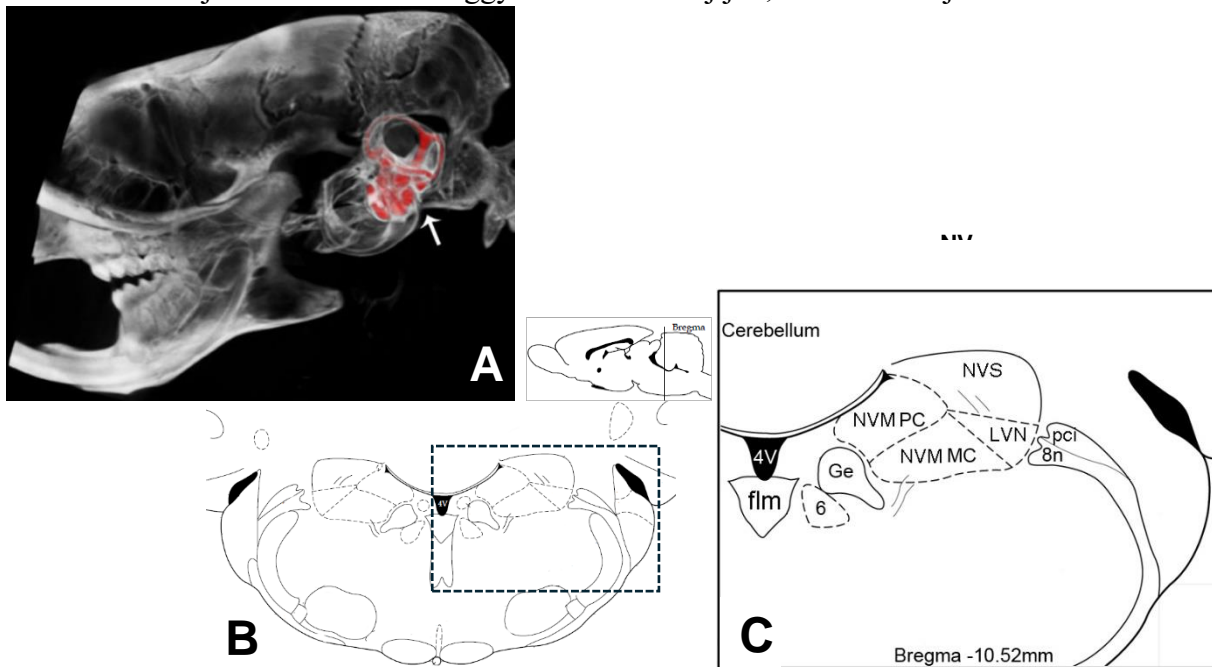
Az egyensúlyozó érzékszerv receptorait magába foglaló belsőfül kiirtásával egyoldali vestibularis laesiot lehet előidézni. A vestibularis deafferentáció dinamikus és statikus tünetekben nyilvánul meg: testtartási és szemmozgási zavarokat eredményez, spontán nystagmussal jár és az izomtónus aszimmetrikussá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

normalizálódása már az axonális sprouting megindulása előtt megkezdődik, ami arra utal, hogy a neuronhálózatok szintjén egy synapticus reorganizáció történik (Deak A et al., 2012; Faralli et al., 2016)

Mindezen adatok felvetik annak gondolatát, hogy az extracelluláris matrix aktív szerepet játszik a neuronális plaszticitásban és regenerációban (Deak A et al., 2012; Dityatev A and Rusakov DA, 2011; Halasi G et al., 2007). Arra vonatkozóan azonban nincsenek adatok, hogy a különböző proteoglycan molekulák és a glycoproteinek milyen mértékben járulnak hozzá a vestibularis rendszer plaszticitási folyamataihoz, valamint az sem ismert, hogy az esetleges ECM változások egyformán érintik-e az agytörzsi vestibularis magkomplex valamennyi tagját (Racz E et al., 2014).

## 2.1 A vestibularis rendszer agytörzsi apparátusa

Az egyensúlyzó rendszer érzékszerveit a sziklacsont belsejében a labirintus tartalmazza (2. ábra A). A csontos köpenyben belül, annak alakját követve, fut a hártályos labirintus. Ennek falában található a lineáris- és szöggyorsulás érzékszerveit, az ún. szőrsejtjeit.



### 2. ábra. Az egyensúlyzó rendszer patkányban.

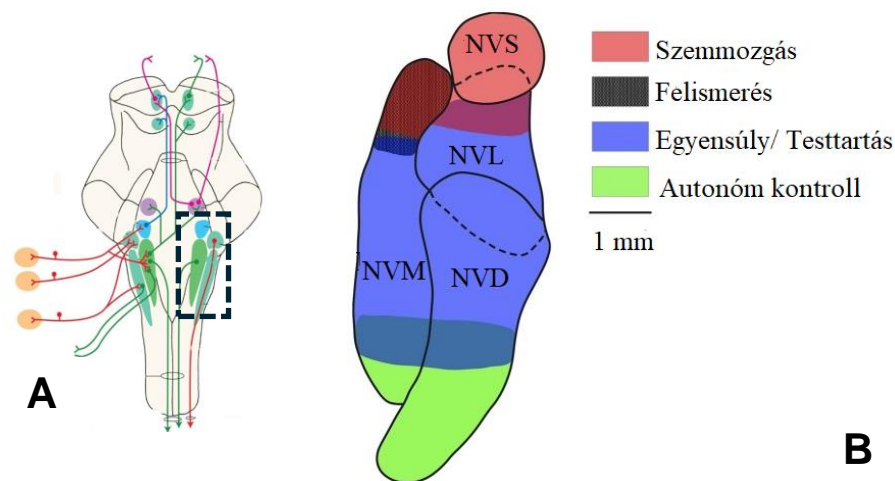
A. eger belső fül mikro CT felvételén piros színnel jelölték a perilymphás teret **Forrás:** Counter et al. (2015); B. patkány agytörzs keresztmetszeti rajza a pedunculus cerebellaris inferior szintjében. C. kinagyított agytörzsi metszet a vestibularis magok ábrázolására, melyet a (B. ábra) szaggatott vonallal jelölt részből vettünk. **4V:** IV. agykamra; **flm:** fasciculus longitudinalis medialis; **6:** nucleus n. abducentis; **Ge:** geniculum internum n. VII.; **pci:** pedunculus cerebellaris inferior; **8n:** n. vestibularis; **NVS:** nucleus vestibularis superior; **NVM MC:** nucleus vestibularis medialis magnocellularis osztata; **NVM PC:** nucleus vestibularis medialis parvocellularis osztata; **NVL:** nucleus vestibularis lateralis. **Forrás:** módosítva Paxinos és Watson (1998).

Szöggyorsulást a három félkörös ívjárat ampulláinak *crista ampullaris*-ai, míg a lineáris gyorsulást az *utricle* és *sacculus* maculái érzékelik (Röhlich P, 2014). A *ganglion vestibulare* (Scarpa) bipoláris neuronjainak perifériás nyúlványai synaptisálnak a szőrsejtekkel, centrális axonjai pedig az agytörzsi vestibularis magkomplexben végződnek. A Scarpa ganglionból egységes kötegben lép ki a *nervus vestibularis* s fut az agytörzsbe, a híd-nyúlvelő szöglet ventralis felszínén, közvetlenül a *pedunculus cerebellaris inferior* alatt (Szentágothai J, 1971).

A patkány vestibularis magkomplexuma négy magból áll a híd és nyúlvelő nyílt részének dorsolateralis területén (2. ábra B, C). Leleteink feldolgozása során a Suarez et al., (1993) által közölt morfometriai leírást vettük alapul, az alábbi alapértékeket kiemelve:

- **A nucleus vestibularis superior (NVS)** (Bechterew) a híd-nyúlvelő határon elhelyezkedő rövid rostro-caudalis kiterjedésű mag, végpontjai a *pedunculus cerebellaris superior* és *nucleus nervi abducentis* szintjeiben vannak. Átlagos rostro-caudalis hossza  $0,72 \pm 0,16\text{mm}$ , térfogata:  $0,34 \pm 0,08\text{mm}^3$ , átlagosan 3459 sejtet tartalmaz. A magot alkotó neuronok átlagos legnagyobb átmérője  $24,05 \pm 6,45\mu\text{m}$  (12,94 és  $57,23\mu\text{m}$  között), a sejtek 25%-a kisméretű,  $20\mu\text{m}$ -nél kisebb átmérővel rendelkezik. A sejtek 64%-a közepes méretű ( $20\text{-}35\mu\text{m}$ ), és 6%-ban található nagyméretű neuron ( $>35\mu\text{m}$ ). A sejtmag rostralis és caudalis részének neuron átmérő megoszlása hasonló.

A NVS közepes- és nagyméretű neuronjait borító perineuronális hálók mutatták a legintenzívebb ECM halmozást a laborunkban elvégzett szemikvantitatív és optikai denzitás mérések alapján a patkányban (Racz et al., 2014).



**3.ábra: A jobboldali vestibularis magkomplexum rostro-caudalis kiterjedése (A) és funkciói (B) Forrás: A. <https://www.nasafordocors.co.za/articles.php?cid=9&id=40&aid=351>; B. módosítva McCall and Yates (2011).**

- **A nucleus vestibularis medialis (NVM)** (Schwalbe) A legnagyobb rostro-caudalis kiterjedésű mag, hossza  $1,58 \pm 0,21\text{mm}$  (**2. és 3. ábrák**). Ebből adódóan ebben a magban van a legmagasabb sejtszám is, átlagosan 15553 neuron. A magot alkotó neuronok átlagos legnagyobb átmérője  $20,49 \pm 5,3\mu\text{m}$  ( $6,88 - 44,06\mu\text{m}$ ), melyek kis-, közepes- és nagyméretű csoportokra szegregálódnak. A sejtek 53,5%-a kisméretű,  $20\mu\text{m}$ -nél kisebb átmérővel rendelkeznek. A sejtek 45,5%-a közepes méretű ( $20-35\mu\text{m}$  közötti átmérő), valamint a neuronok 2%-a nagyméretű ( $>35\mu\text{m}$ ). A domináns sejátmérők alapján két almagra választható a NVM: (I) a közepes méretű neuronokat tartalmazó **magnocellularis** almag közvetlenül a IV. agykamrával határos, a (II) **parvocellularis** almag pedig az előző fedésében van és kisméretű neuronokkal rendelkezik (Johnston AR et al., 1994; Saito Y et al., 2008; Takazawa T et al., 2004). A két almag kapcsolatrendszere és funkciója is eltér, mely kettősség konzervatív, patkányon kívül egérben (Camp AJ et al., 2006; Sekirnjak C and du Lac S, 2006), és tengerimalacban is ugyanúgy megfigyelték (Babalian A et al., 1997; Babalian AL and Vidal PP, 2000; Serafin M et al., 1991). A magnocellularis terület közepes méretű sejtjei szabálytalan tüzelésűek, neurotranszmittereik glutamát vagy glicin. A parvocellularis GABAerg neuronok szabályos tüzelési mintázattal rendelkeznek. Más tanulmányok a NVM neuronjainak további csoportosítását szorgalmazták a neuronok eltérő fiziológiai tulajdonságai, axonális kapcsolataik és/vagy transzmitter expressziójuk alapján (Bagnall MW et al., 2007; du Lac S and Lisberger SG, 1995; Kolkman KE et al., 2011; Sekirnjak C et al., 2003; Shin BS et al., 2012; Straka H et al., 2005; Takazawa T et al., 2004).

Több leírás, ill. laborunk saját felismerése (Racz et al., 2014) arra is rámutatnak, hogy a NVM nagyméretű neuronjait fedi ún. perineuronális háló, ill. igen alacsony létszámban bizonyos parvocellularis neuron populációt is.

- **A nucleus vestibularis lateralis (NVL)** (Deiters) Az NVL-t alkotó neuroncsoport legnagyobb hossza  $0,85 \pm 0,16\text{mm}$ , átlagosan 2430db sejtet tartalmaz (Suarez C et al., 1993). A magot alkotó neuronok átlagos legnagyobb átmérője  $34,21 \pm 12,12\mu\text{m}$  ( $12,65-74,88\mu\text{m}$ ), a sejtek 9%-a kisméretű,  $20\mu\text{m}$ -nél kisebb átmérővel rendelkeznek. A sejtek 45,5%-a közepes méretű ( $20-35\mu\text{m}$ ), és 41%-ban található nagyméretű ( $35-50\mu\text{m}$ ) és óriás neuronok ( $>50\mu\text{m}$ ). Az eltérő méretű neuronok az NVL-n belül nem különülnek el, mint a NVM esetében.

A perineuronális hálók festődési különbségei itt is szembetűnők, jól festődő PNN csak a óriás neuronok körül figyelhető meg (Racz E et al., 2014).

- **A nucleus vestibularis descendens (NVD) (Roller):** A NVD hossza elmarad a NVM-től, átlagosan  $1.18 \pm 0.2\text{mm}$ , de a négy vestibularis mag közül ez a legcaudalisabb elhelyezkedésű. A magot átlagosan 13283 sejt építi fel. A magot alkotó neuronok átlagos legnagyobb átmérője  $25,24 \pm 8,0\mu\text{m}$  ( $10,88 - 62,77\mu\text{m}$  között), a sejtek 26%-a kisméretű,  $20\mu\text{m}$ -nél kisebb átmérővel rendelkeznek. A sejtek 62%-a közepes méretű ( $20 - 35\mu\text{m}$ ), és 12%-ban található nagyméretű ( $35-50\mu\text{m}$ ) és óriás neuronok ( $>50\mu\text{m}$ ). A nagy és óriássejtek jellemzően a rostralis területen detektálhatóak, a közepes méretű sejtek hasonló arányban, míg a kisméretű sejtek főként a caudalis területen helyezkednek el (Suarez C et al., 1993).

A perineuronális hálók festődési intenzitása a rostralis területen erősebb, mint a caudalis régióban, mely valószínűleg összefüggésbe hozható a rostralis területen magasabb arányban előforduló nagyméretű sejtekkel és az eltérő efferenciációval (Racz E et al., 2014).

## 2.2 A vestibularis magkomplexum afferens és efferens kapcsolatai

Igen kiterjedt afferens és efferens kapcsolatrendszer (1. ábra), valamint kétoldalisága folytán széles neurotranszmitter repertoár van jelen a vestibularis neuronhálózatban. Serkentő (glutamát) boutonok a *ganglion vestibulare*-ban eredő primer afferensek terminálisai, melyek a másodrendű neuronok dendritfáján és sejttestjein végződnek. Gátló bemenetek (GABA, glicin) több irányból érkeznek. A laesio tüneteinek és kompenzációjának jobb megértéséhez a vestibularis magkomplexum kapcsolatrendszerét lentebb ismertetjük:

### 2.2.A Afferens kapcsolatok:

Patkányban a NVL rostralis része az ipsilaterális *utrículusból* és a félkörös ívjáratok felől kap afferenseket. Afferensek a NVM *magnocellularis* osztatához a félkörös ívjáratok és a flocculo-nodularis lebenyből érkeznek, a *parvocellularis* részéhez pedig az otholith szervek felől.

A félkörös ívjáratokból származó afferensek a magcsoport rostralis részében, a superior, medialis és lateralis magokban végződnek. A *sacculus* és *utrículus* maculáiból származó afferensek a magkomplexum caudalis részében is synaptisálnak. Mind a négy mag további

afferenseket kap a gerincvelőből, illetve a vestibulocerebellumból, közvetlenül a Purkinje-sejtektől, ill. *nucleus fastigii*-ből. Legkiterjedtebben a NVS, mely a szemmozgások koordinálásában vesz részt (Kang S et al., 2021; Walberg F, 1972).

### 2.2.B Efferens kapcsolatok:

Általánosságban elmondható, hogy a rostralis területek és ezen belül a *magnocellularis* neuronok fő efferensei a nagyméretű szemmozgató motoneuronok axonjai, melyek a *fasciculus longitudinalis medialis* (FLM) közvetítésével futnak a szemmozgató agyidei magokhoz és nyakizmokhoz (Matesz C et al., 1997; McCall AA and Yates BJ, 2011; Shiroyama T et al., 1999). Így funkciókiesés kapcsán kóros vestibulo-ocularis reflex, kóros szemtengelyállás és nystagmus alakul ki. A kissejtes régiók leggyakoribb efferense a gerincvelő, ezért a vestibularis laesio során kiváltott tünetek a kóros fej- és testtartásért, az akaratlan, esést elkerülő ún. hengergő mozgásért, az ellenoldali végtagok extenziójáért és az azonos oldali végtagok flexiójáért felelős (Matesz C et al., 1997; McCall AA and Yates BJ, 2011; Shiroyama et al., 1999).

A NVS nagyméretű neuronjai serkentő synapsisokat hoznak létre az oculomotorius és trochlearis neuronokkal (Highstein SM, 1971; Ito M et al., 1970; McCrea RA et al., 1987; Mitsacos A et al., 1983). A centrális helyzetű közepes méretű sejtek axonjai a vestibuloocularis reflex efferensei (Diaz C et al., 2003; Pasqualetti M et al., 2007). Az NVS kisméretű neuronjai a mag perifériás, vagy nem ocularis régiójából a kisagyba és a *formatio reticularis* felé továbbítanak axonokat, és commissuralis kapcsolatokat hoznak létre (Ladpli R and Brodal A, 1968; Mitsacos A et al., 1983).

A NVM *magnocellularis* efferensei a gerincvelő és a szemmozgató magok felé vezetnek, valamint egy köteg a *corpus mamillare* irányába, így laesio esetén sérül a térbeli felismerés és orientáció is (Brown SM et al., 2005; Shinder ME and Taube JS, 2010). A NVM *parvocellularis* neuronjai az *oliva inferior*ba küldenek efferenciát, azaz laesio esetén a vázizomműködés koordinálása szenved zavart (Pompeiano O and Brodal A, 1957; Ruigrok TJ and Voogd J, 1990).

A NVL nagyméretű neuronjai a gerincvelő lumbosacralis területével állnak kapcsolatban, valamint a szemmozgató magokkal. A *tractus vestibulospinalis lateralis* révén a gerincvelő motoros szarvának motoneuronjaival képeznek synapsist. Így közvetlenül hatással vannak az ellenoldali extensorok fokozott izomtónusára, vestibularis laesio kapcsán az azonos oldali végtagok extenziós izomtónusa gyengül (Bacsikai T et al., 2002; Pompeiano O

and Brodal A, 1957; Ruigrok TJ and Voogd J, 1990). Caudalis részének efferensei főként a gerincvelő és *oliva inferior* felé projiciálnak.

A NVD caudalis része efferenciát a *nucleus tractus solitarii*-ből, a *nucleus dorsalis nervi vagi*-tól, ill. a gerincvelő visceroszenzoros kötegeiből, melyek cardiovascularis és emésztő tractus szabályozásában vesznek részt (Holstein GR et al., 2011; Matesz C et al., 1997; Porter JD and Balaban CD, 1997; Ruggiero DA et al., 1996).

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

A központi idegrendszer térfogatának hozzávetőleg 20%-át alkotja a sejtközzéti állomány, melynek tereiben az extracellularis matrix (ECM) komplex hálózata van jelen (Nicholson C and Sykova E, 1998). Az ECM a sejtek helyzetét stabilizálja, valamint a sejtközzéti terek cytokin, neurohormon és növekedési faktorok forgalmát, és az extracellularis tér ion egyensúlyát optimalizálja. E szerepét mintegy öt évtizede ismerték fel (Tani E and Ametani T, 1971), illetve felismerték a regionális különbségeit összetétele tekintetében, amely meghatározza a lokálisan betöltött funkcióit (Margolis RK et al., 1975). Az idegszöveti ECM-et a következő makromolekulák alkotják: **I. hyaluronsav (HA)**; **II. chondritin-sulfat proteoglycan-ok (CSPG)**; **III. glycoproteinek**; és **IV. kötőfehérjék (link protein)** (Bacsikai T, Szekely G and Matesz C, 2002; Carulli D et al., 2006; Dityatev A and Schachner M, 2003; Matesz C et al., 2005; Racz E et al., 2014; Ritok A et al., 2022). Az idegrendszeren kívül eső szövetek ECM-ában gyakori kollagén típusok a KIR extracellularis matrixában nem fordulnak elő. A hyaluronsavat, a kötőfehérjéket és az aggrecant kizárólag a neuronok szintetizálják, a többi ECM-molekula előállításában az oligodendrocyták és az astrocyták is részt vesznek (Carulli D et al., 2006; Lander C et al., 1998).

#### **2.3.1 Hyaluronsav**

A hyaluronsav D-glükuronsav és N-acetil-D-glükózamin dimerekből, váltakozó  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) és  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) glikozidos kötésekkel felépülő polimer óriásmolekula. A diszacharid monomerek száma 2000 és 25000 közötti, a teljes lánc hosszúsága pedig 2–25  $\mu$ m-re tehető (Necas J et al., 2008). A hyaluronsav további szerkezeti jellemzői a nagy molekulatömegén túl, hogy nem szulfatált, viszont karboxilált, illetve a kettős spirális konformáció, mely elágazásmentes (Toole BP, 2004). A vestibularis magkomplexumban, laborunk korábbi leírása szerint (Racz E et al., 2014), a HA diffúz eloszlásban van jelent a neuropilben és kondenzált

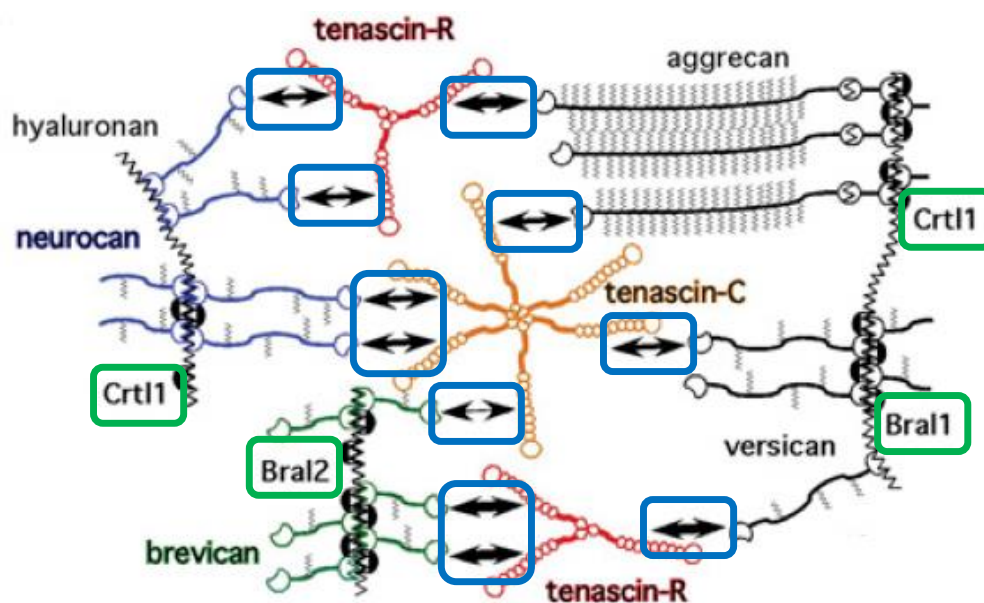
formában a perineuronális hálókbán. A proteoglycanok N-terminálisa, link proteinek stabilizálása mellett, kapcsolódik a hyaluronsav láncokhoz.

A hyaluronsav élő szervezetekben a hyaluronsav-szintázok (HAS1-3) terméke, melyekből a gerinces élőlények három típusal rendelkeznek: HAS1, HAS2, és HAS3. E szintázok nem csak termelik, hanem sejt felszíni kihorgonyzásukért is felelősek. Ezek az enzimek ismétlődően hozzáadott D-glükuronsav és N-acetil-D-glükózamin alegységekkel hosszabbítják meg a hyaluronsav molekulát (DeAngelis PL, 1999; Spicer AP and McDonald JA, 1998).

A hyaluronsav szöveti szintjeit vestibularis laesioban egy korábbi kutatásunk vizsgálta (Deak A et al., 2012), melyre jelen értekezés részleteiben már nem tér ki.

### 2.3.2 Proteoglycanok

A központi idegrendszerben található proteoglycanok (4. és 5. ábrák) fontos szerepet játszanak a sejtek közötti kommunikációban, az axonok fejlődésében, irányításában, az idegsejtek differenciálódásában és a sejtek közötti adhézióban. Nagy molekulatömegű komplexek, melyekben egy hosszú core protein alkotja a molekula vázát, és hozzá az eltérő hosszúságú glükózaminoglycan oldalláncok (GAG) csatlakoznak (4. ábra). A GAG láncok ismétlődő diszacharidokból álló lineáris polimerek, a diszacharid monomereket egy uronsav és



4. ábra: Proteoglycanok kapcsolatai ECM makromolekulákkal és térbeli elhelyezkedésük sémásan. Proteoglycanok tengelyfehérjéi N-terminálisukkal a hyaluronsav láncokhoz kapcsolódnak. Kapcsolatukat link proteinek stabilizálják (zöld keretek; Bral1, Bral2, CrtI1). C-terminálisuk tenascinohoz kapcsolódik (kék keretek), így térhálót alakítanak ki az extracelluláris térben. Forrás: Rauch U, (2007)

egy N-acetil glükózamin, vagy N-acetil galaktózamin alkotja. A glycan- monomereket nem kódolja közvetlenül a genom. Monomer szekvenciájuk, lánchosszuk és szulfatációs mintáik a Golgi-apparátusban szabályozott poszttranszlációs változtatásokon esnek át (Hudak JE and Bertozzi CR, 2014).

Jelenleg, a GAG-ok száma és minősége alapján, a proteoglycanok négy fő típusát azonosítják emlősökben: chondroitin-sulfat (CS), dermatan-sulfat (DS), keratan-sulfat (KS), heparan-sulfat proteoglycanok (HS) (Bandtlow CE and Zimmermann DR, 2000; Kowitsch A et al., 2018; Walimbe T and Panitch A, 2020).

A proteoglycanok az idegrendszer fiziológias eseményeinek dinamikusan változó résztvevői, melyek szerephez jutnak a tanulási folyamatokban, a rövid- és hosszútávú memória kialakulásában, az extracellularis anyagforgalomban, és struktúrák stabilizálásában (Bandtlow CE and Zimmermann DR, 2000; Carulli D et al., 2020).

A prenatalisan megjelenő proteoglycanok ún. permisszív hatásúak a neurogenesisre és axonnövekedésre, továbbá képesek megkötni az egyes neurotrop hormonokat, növekedési faktorokat, melyek eredményeként stimulálódik az axonális növekedés és a synaptogenesis. Permisszív karaktere több tényezőnek tulajdonítható: neurogenesis során igen kis mennyiségben vannak jelen proteoglycanok az interneuronális terekben, akkor is majdnem kizárólag V0, V1 versican izoformák és a HA (mely nem proteoglycan) vannak jelen. Ezek, permisszív jellegükön túl, 'axonal guidance' szerepet is betöltenek a hálózatok kifejlődése során. A KIR kifejlett koráig zajló proteoglycan dinamikáját Zimmermann DR and Dours-Zimmermann MT, (2008) írja le, melyben a funkciós rendszerek kifejlődéséhez időzítik a HA-proteoglycan-TN-R térhálózat felépülését.

Postnatalisan az idegi hálózatok fejlődése koránt sem fejeződik be, viszont egészen más megfontolásokat és dinamikát követ. A neurogenesis és synaptogenesis a legtöbb rendszerben lelassul, ill. megáll, funkciós rendszerek tapasztalatszerzés útján működésükben specializálódnak, és mindeközben az ECM ún. non-permisszív karaktert vesz fel. Ez tulajdonítható hasonlóképp több tényezőnek: megjelennek a sejtközötti terekben a szulfatált GAG szubsztituenseket viselő CSPG-ok; mennyiségük morfológiai kimutatásra alkalmas szintekre emelkedik, melyek fizikai barrierként értelmezhetők; valamint adhézió útján kötnek több axon növekedést gátló faktort (pl. NoGo).

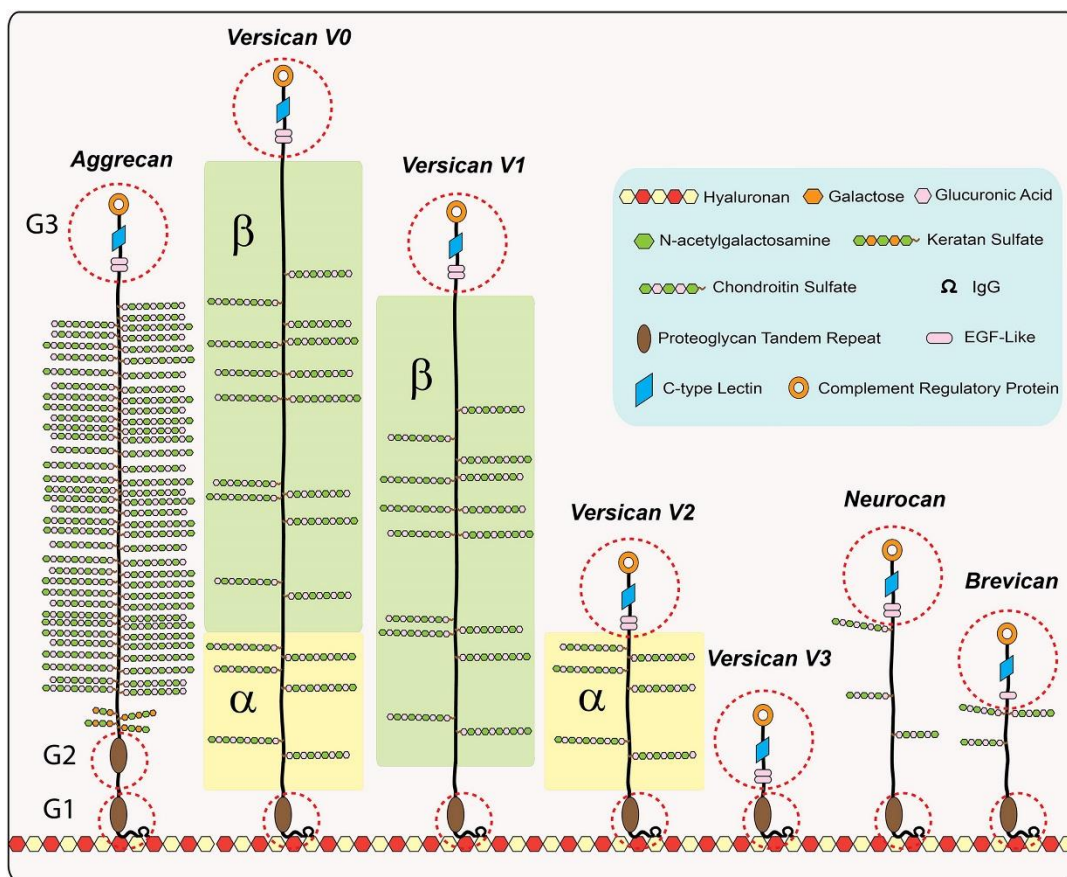
A vér-agy gát felépítésében barrier funkciójuk kiemelendő. A heparan-sulfat proteoglycanok sejtfelszíni molekulaként működnek és számos ligandhoz képesek kötődni, lehetővé téve a sejtek közötti kommunikációt és adhéziót (Walimbe T and Panitch A, 2020). A

neuronalis sejtmembránban a HAS1-3, a CD44, a RPTP6, és Contactin-1, melyek CSPG kötő receptorok (Oohashi T et al., 2015) kapcsolják a cytoskeletonhoz.

A CSPG-k jelenléte és működése a KIR-ben komplex, számos normális és kóros folyamatban kulcsszerepet játszanak. Emiatt potenciális célpontokká váltak az idegrendszeri betegségek kutatásában (Kowitsch A et al., 2018).

### 2.3.2.1 Chondroitin-sulfat proteoglycanok

A lecticanok csoportjába négy óriásmolekula sorolható: *aggrecan*, a *versican*, a *neurocan* és a *brevican* (5. ábra). Jelen értekezés a *brevican*t vizsgálta, így a legrészletesebb leírás erre a molekulára összpontosít.



**5. ábra.** HA-kötő proteoglycanok, ún. lecticanok sematikus ábrázolása. A tengelyfehérjék hossza, különböző számú és arányú glükózaminoglycan szubsztituensei és fejlődéstani alváltozatai alapján különíthetők el. **Forrás:** Iozzo RV and Schaefer L, (2015).

### *Aggrecan*

Az aggrecan HA-val összekapcsolódva óriási, 200 MDa-nál is nagyobb térbeli hálózatot épít fel (**5. ábra**). Hosszú tengelyfehérjéhez több, mint 100 szulfatált GAG oldallánc csatlakozik kovalens kötéssel, emiatt erősen negatív töltésű, így jelentős a kation megkötő képessége szabályozza az ozmotikus egyensúlyt és támogatja a nagy sebességű synapticus jelátvitelt. A G3 globuláris domén képes kapcsolódni a PNN-ben előforduló tenascin-R-hez is (Iozzo RV and Schaefer L, 2015). Az aggrecan mind a perineuronális hálóban mind pedig a neuropilben kimutatható. Laborunk korábbi megfigyelései szerint patkányok vestibularis neuronjainak perineuronális hálóiban az aggrecan a legnagyobb mennyiségben jelen lévő CSPG (Racz E et al., 2014).

### *Versican*

A GAG oldalláncok lokalizációja és a tengelyfehérje hossza alapján, ill. a fejlődési stádium figyelembevételével négy izotípust különböztetnek meg: a V0, a V1, a V2 és a V3 (Zimmermann DR and Ruoslahti E, 1989). A legtöbb szövet extracelluláris terében előfordul (Braunewell KH et al., 1995). Embryonális korban a V0 és V1 izoformák vannak jelen, melyek az axonnövekedést serkentik az idegi hálózatok kialakulása során (Milev P et al., 1998; Zimmermann DR and Dours-Zimmermann MT, 2008). A kifejlett KIR-ben a V2 izoformáját expresszálják oligodendrocyták. Jelenléte pontszerű, nem csak a PNN területén mutatható ki, hanem a nodalis ECM-ban is. Hatással van az axonok myelinizációjára, KIR sérülés esetén a V2 versican is felhalmozódik a sérülés helyszínein, hozzájárulva az non-permisszív környezet kialakulásához (Iozzo RV and Schaefer L, 2015).

### *Neurocan*

A tengelyfehérjén 7db szulfatált GAG megkötésére alkalmas kötőhely van (Iozzo RV and Schaefer L, 2015). Molekulatömege 245kDa.

Csak a KIR-ben van jelen, ahol gátolja a neuritok *in vitro* növekedését kifejlett korban. Ennek megfelelően megfigyelték, hogy a KIR mechanikai és ischaemiás sérüléseinek helyén megnövekszik a neurocan expressziója (Liu BP et al., 2006). Előfordulása a Ranvier-féle befűződésekben és a PNN-ban jellemző (Racz E et al., 2014).

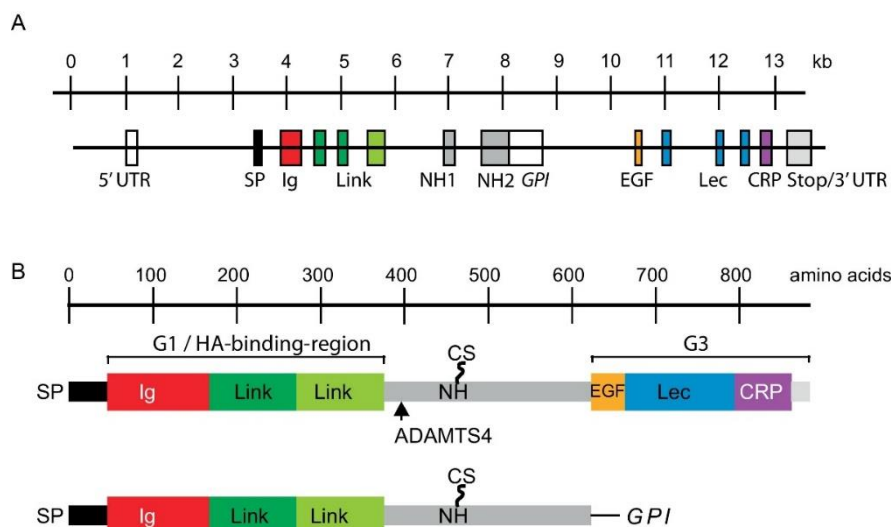
### *Brevican*

Az aggrecan mellett a brevican igen domináns jelenléte jellemzi a neuropilt, PNN-kat és perisynapticus tereket, így kutatásunk fókuszába került (Bruckner G et al., 2008;

Frischknecht R and Seidenbecher CI, 2012). Racz et al., (2014) leírása alapján magas expressziója jellemzi a patkány vestibularis magkomplexumának három magját (NVS, NVM, NVL); e magokban dominánsan jelen lévő közepes, ill. nagyméretű neuronok perineuronális hálót.

Újszülött patkányokban az első postnatalis héten csak kevés transzkriptum van jelen, az expresszió fokozatosan növekszik, és a felnőtt egyedeknél éri el a platót (Seidenbecher CI et al., 1998). A brevicant gliasejtek és neuronok is termelik (John N et al., 2006; Seidenbecher CI et al., 1998; Yamada H et al., 1994), majd beépül a neuronok körüli ECM-be (Carulli D et al., 2006), vagy közvetlenül a sejtfelszínhez kötődik (Frischknecht R et al., 2009; Hedstrom KL et al., 2007).

Molekulatömege 140kDa. A globuláris szerkezetű N-terminális doménje (G1) tud kapcsolódni a HA-hoz, ezen kívül tartalmaz egy immunglobulin szerű hurkot és két link protein szakaszt. A tengelyfehérje középső szakasza nem homogén, mindössze 1-5 számú chondroitin-sulfat oldalláncot hordoz. A HA-tól távol eső C-terminális doménjén található EGF (epidermal growth factor) modul, lectin szerű modul, valamint complement regulátor protein, mely utóbbi rendelkezik tenascin-R kapcsolódási affinitással (Celio MR et al., 1998) (**6. ábra**). A brevican a neuronok közvetlen felszínén van, aggregan után a legnagyobb mennyiségben megjelenő PNN alkotó. Perisynapticus jelenléte ismert, és a tudományos irodalom véleménye összevág abban, hogy non-permisszív hatását az axonok újránövekedéséhez a KIR-ben (Celio MR et al., 1998; Frischknecht R and Seidenbecher CI, 2012).



**6. ábra: A brevican szerkezete.** A brevican DNS szekvenciája, mely patkányban a 3. kromoszómán található. **B:** brevican moduláris felépítése (részletei a brevican szöveges leírásában). **Forrás:** Frischknecht R and Seidenbecher CI, (2012).

A vestibularis kompenzáció vizsgálata mellett további humán vonatkozású brevican vizsgálatok zajlanak a brevican glioma tumorgenezisében betöltött szerepét illetően (Jaworski

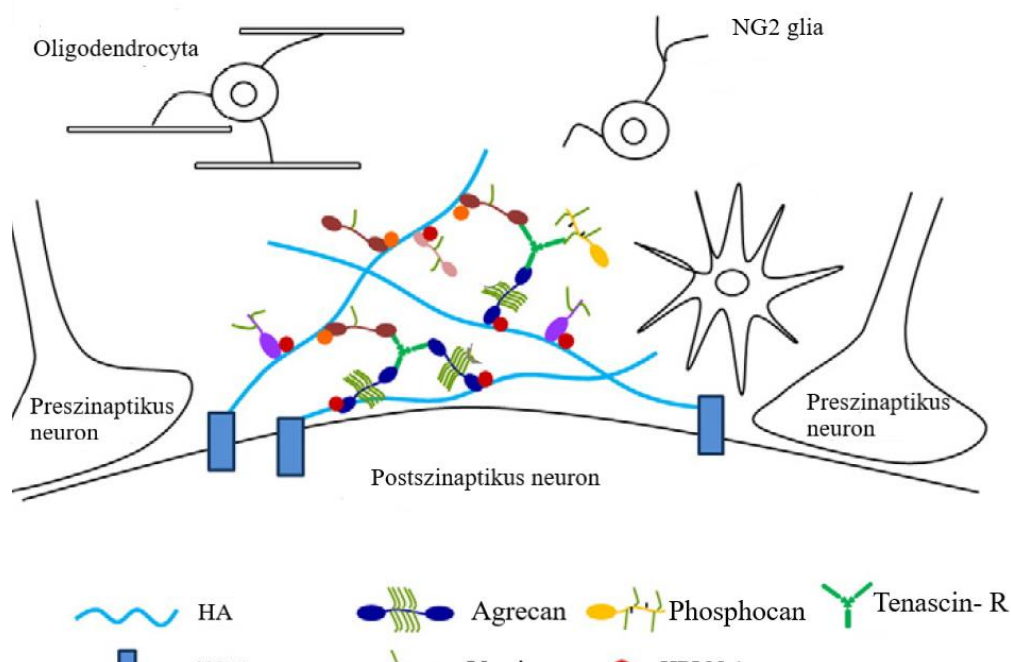
DM et al., 1996), az Alzheimer-kór molekuláris hátterét kezdeményező vizsgálatokban (Morawski M et al., 2010) és a gerincvelőt érő mechanikai sérülést követő regenerációs folyamatokban betöltött szerepe miatt (Jones LL et al., 2003).

### 2.3.3 Glycoproteinek az extracellularis matrixban

Az központi idegrendszer extracellularis matrixának bonyolult rácsos térszerkezetében a HA-CSPG aggregátumokat háromdimenziós térhálónak kapcsolják össze a TN-R glycoproteinek, valamint a HA-CSPG kapcsolatot stabilizálja a szintén glycoprotein karakterű link protein család két tagja (7. ábra).

### 2.3.4 Kötőfehérjék: Hyaluronan and Proteoglycan Link Protein (HAPLN)

A családhoz tartozó glycoproteinek globuláris szerkezetű, mintegy 250kDa molekulatömegűek. Jelenlétüket először porc szövetben írták le cartilage link protein 1 (CRTL1) néven, ám később más szövet típusokban, így idegszövetben is felismerték és a HAPLN1 elnevezést kapta (Milev P et al., 1998). A KIR-ben a neuronok termelik, az ECM általános stabilizálásában vesz részt, így kiváltképp a perineuronális hálókéban (4. és 7. ábrák). A V2 versican kivéve CSPG-k és a HA között létesít kapcsolatot (Oohashi T et al., 2015).



7. ábra A perisynaptikus ECM funkciói: synaptikus morfológia megtartása; kihorgonyzás a pre- és postsynaptikus membránokhoz; neurotransmitter diffúzió befolyásolása, valamint jelátvitel. Megfigyelések szerint a pre-synaptikus matrix a synapsis aktivitásától függő dinamikus struktúra. **Forrás:** Oohashi T et al., (2015).

Más izotípusai, a HAPLN2 (Bral1) és a HAPLN4 (Bral2) a központi idegrendszerre specifikusak, más szövetekben nem fordulnak elő (Spicer AP et al., 2003). A HAPLN2-t főként az oligodendrocyták termelik, és a perinodalis ECM-ban halmozódik (**7. ábra**); a HAPLN4 pedig a perineuronális hálóban fordul elő, az idegsejtek termelik, a HA és a brevican közötti kötést stabilizálja (Bekku Y et al., 2003; Hirakawa S et al., 2000; Oohashi T et al., 2015).

A HAPLN3 (Lp3) a KIR-ben nem expresszálódik (Spicer AP et al., 2003).

### 2.3.5 *Tenascin*

Glycoprotein karakterű molekula család, melyek felépítésük és expressziójuk alapján négy altípusba különíthetők el emlősben: a tenascin-R (TN-R), tenascin-C, a tenascin-X, tenascin-W (Chiquet-Ehrismann R and Tucker RP, 2011).

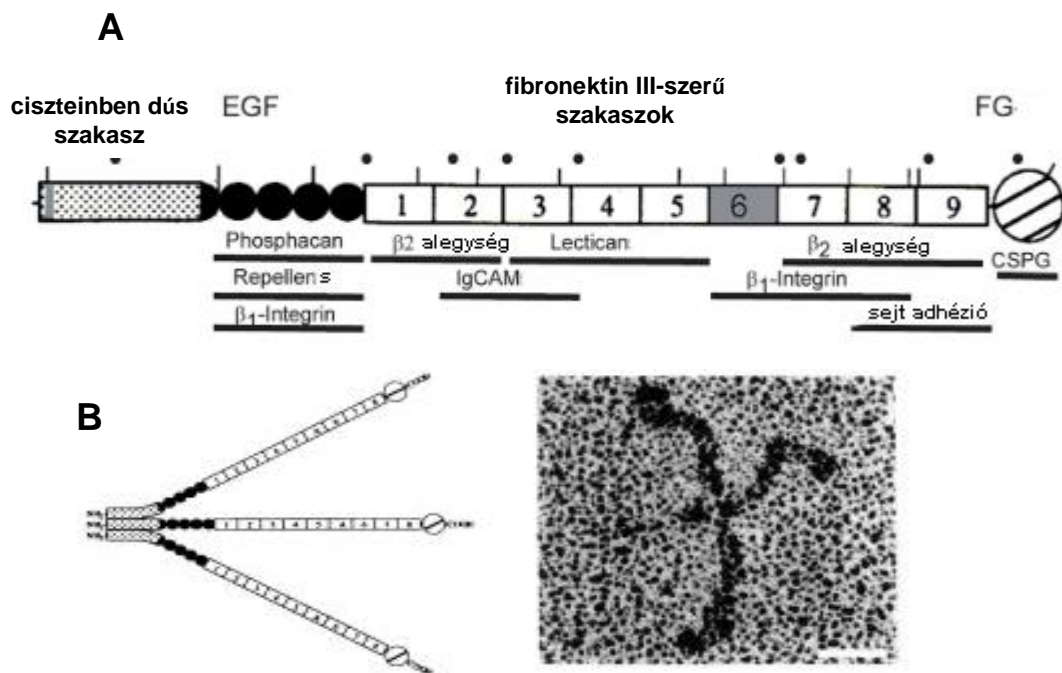
A tenascin típusok hasonló moduláris felépítésű makromolekulák. Az N-terminálisuk ciszteinben gazdag, mely oligomerizációját mediálja. Ott 3-4  $\alpha$ -helix heptád ismétlődik, ill. epidermal growth factor egységek, majd a molekula középső részében fibronectin III domének. A C-terminális egy fibrinogén-szerű globuláris komplex. Ezek száma meglehetősen eltérhet az egyes tenascin típusokban alternatív splicing után. Heptádjá közvetítésével képes homotrimerek vagy hexamerek kialakítására az N-terminálisok összekapcsolásával, ily módon kap szerepet az ECM térhálósításában.

**Jelen értekezés a TN-R expresszióját vizsgálja vestibularis érzékszervi laesio következményeként, így a lenti leírás erre a molekulára összpontosít.**

#### ***Tenascin-R***

Szerkezetében összesen 4,5 EGF és 9 fibronectin III ismétlődik, ill. két splice variánsa létezik 160 és 180kDa molekulatömegben alegységként. A TN-R homotrimer formában fordul elő az ECM-ben (**8. ábra**).

A TN-R számos ECM molekulához köthető, ill. sejt felszíni ligandhoz is kapcsolódik. Említhetők integrinek, heparan-sulfat proteoglycanok, ezeken kívül sejtadhéziós molekulák az immunglobulin szupercsaládból (contactin, axonin TAG-1, neurofascin). Más sejt felszíni molekulák is affinitást mutatnak, pl. annexin II és a receptor tyrosine phosphatase. Más ECM partnerekkel is erősen összekapcsolódik a C-terminálisán elhelyezkedő fibrinogén-szerű doménnel, így az említett lectinok G3 doménjén keresztül az aggrecannal, brevicannal és neurocannal (Jang B et al., 2020; Jones FS and Jones PL, 2000; Zimmermann DR and Dours-Zimmermann MT, 2008).



**8. ábra. A tenascin-R szerkezete.** **A.** tenascin-R moduláris felépítése (részletei a szöveges leírásában). **B.** tenascin-R homotrimer megjelenése a felnőtt idegszövet sejtközötti tereiben. **EGF:** epidermal growth factor; **FG:** fibrinogén-szerű domén. **Forrás:** Rathjen FG and Hodge R, (2021)

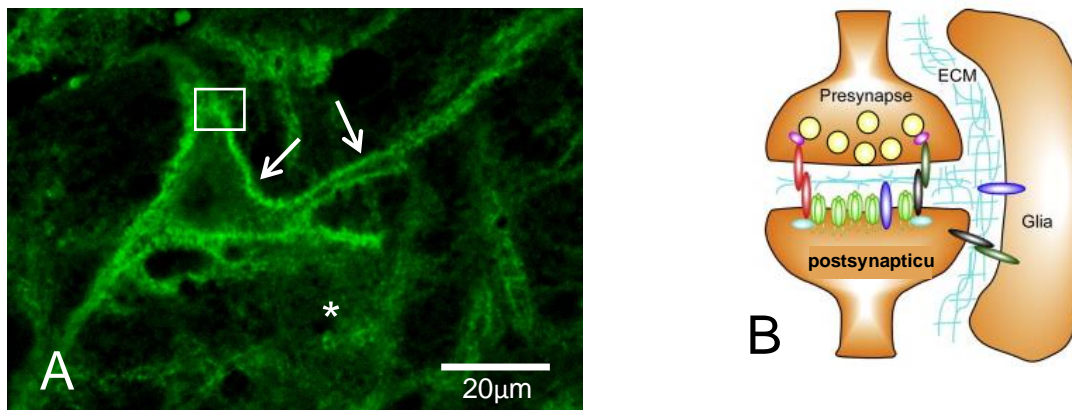
A tenascin-R és a tenascin-C molekulák jelentős szereppel bírnak a perineuronális háló végső elrendeződésének kialakításában. Ezt bizonyítják a tenascin-R knock-out egereken végzett vizsgálatok, amelyek során CSPG-ok abnormális aggregációját figyelték meg, valamint ezzel összefüggő migrációs zavarokat (Carulli D et al., 2006; Galtrey CM and Fawcett JW, 2007). A humán onkológiai kutatások során a KIR lokalizációjú tumorok tenascin-C expressziója bizonyos daganatok stromájában rossz prognózissal jár fokozott áttétképződés miatt (Chiquet-Ehrismann R and Tucker RP, 2011). További tenascin-R és tenascin-C vonatkozású humán megfigyeléseket is publikáltak retinában glaucoma során (Wiemann S et al., 2021), gerincvelői laesiókban (Apostolova I et al., 2006), astrocytomában és hippocampusban szeparációs szorongás alatt (Dimatelis JJ et al., 2013).

A tenascin-X és tenascin-W molekuláknak idegrendszeri vonatkozása nem ismert (Chiquet-Ehrismann R and Tucker RP, 2011).

## 2.4 ECM szerveződési formái a központi idegrendszerben

(1) A *membrana limitans gliae perivascularis*-hoz és *-superficialis*-hoz tartozó *membrana basalis* a KIR szövetei és a cerebrovascularis rendszer között teremt barriert, valamint a subpialis lemezben is jelen van. A KIR-ben kizárólag ebben található kollagén, ezen kívül megtalálható benne entactin, fibronectin, distroglycan és perlecan (Lau LW et al., 2013).

(2) Perineuronális háló (PNN) tipikusan a perikaryon körül szerveződő, igen sűrű ECM szövedék. Dendriteket, valamint az axonkúpot is éppúgy körülveszi, melyet több agytörzsi területen leírtak laborunk munkatársai (Racz E et al., 2014; Ritok A et al., 2022). A PNN összetételének, funkciójának meghatározását számos egymástól független munkacsoport dokumentálta emlősökben, kétélűekben és madarakban (Balmer TS et al., 2009; Celio MR et al., 1998; Matesz C et al., 2005; Meszar Z et al., 2008; Morawski M et al., 2009; Morawski M et al., 2012; Szigeti ZM et al., 2006). Kialakulása erősen összefügg a neuronok méretével, funkciójával, melyek szorosan kapcsolódnak az adott neuron synapticus forgalmával. Immunhisztokémiai jelölése jól kiemeli a somát és nyúlványait, és élesen elkülöníthető a kevésbé denz neuropil matrix környezetétől. ECM összetételét tekintve kimutatható benne a hyaluronsav, többféle CSPG (aggrecan, brevican, neurocan, versican), tenascin-R és több link protein is (Celio MR et al., 1998; Kwok JC et al., 2011; Racz E et al., 2014; Ritok A et al., 2022).



**9. ábra:** Az ECM szerveződési formái a központi idegrendszerben. **A.** aggrecan immunhisztokémiai kimutatása egér formatio reticularis-ában. A perineuronális háló (nyíl) kirajzolja a somát és dendriteket. Lyukacsosmegjelenése az áthaladó axonoknak és boutonoknak tulajdonítható. \*: diffúz ECM a neuropilben. keret: axonal coat. (Forrás: saját felvétel) **B.** Dityatev és Rushakov (2011) felvétele alapján az ECM a kémiai synapsisok dinamikus alkotója. Javaslataikra a synapsisok pre- és postsynapticus membránjai, ill. a synapticus rés mellett a perisynapticus ECM is alapvető strukturális eleme, így az általuk javasolt ún. 'tetrapartite synapse' (értsd 'négyrésztű') terminológia vált elfogadottá. Forrás: módosítva Thalhammer A and Cingolani LA, (2014).

A PNN az idegi hálózatok fejlődése során többszörös átépülésen megy keresztül, és ezalatt betölt kation puffer, axonnövekedést irányító és strukturális szerepeket (Soleman S et al., 2013), ill. funkciós hálózatok kialakulása alatt, a kritikus periódust megelőzően, a synaptogenesist támogatja. A PNN számos sensoros és motoros rendszer neuronjai körül jelen van (Faralli A et al., 2016; Racz E et al., 2014; Ritok A et al., 2022; Szarvas D et al., 2018), megfigyelték létezését továbbá corticalis GABAerg- és pyramis sejtek somája körül (Alpar A et al., 2006), és a gerincvelőben (Pajer K et al., 2021).

(3) Az idegrendszeri interstitialis matrix a neuropil réseiben kimutatható lazán rendezett ECM. Lamina basalis-szal és PNN-val folytonos, viszont morfológiailag, ill. mikroszkópos elemzés során azoktól könnyen elkülöníthető. Molekuláris összetétele igen közeli a PNN-éhez, felépítésében hyaluronsav, CSPG-k glycoproteinek és link proteinek vesznek részt. Megjelenése régióspecifikus (Racz E et al., 2014; Ritok A et al., 2022; Sykova E and Nicholson C, 2008).

(4) Az elmúlt évtizedben vált elfogadottá az axonokat és azok preterminális szakaszait borító igen finom matrix hüvely, az 'axonal coat'. Axon átmérőt (2-4  $\mu\text{m}$ ) követő mérete alapján ismerhető fel immunhisztokémiai jelölésben perisomaticus és peridendriticus helyeken. Első említését Brückner et al., (2008) után ismerjük, ám azóta több munkacsoport, és laborunk is több ízben vizsgálta jelenlétét. Molekulái közül kiemelt fontosságú az aggrecan, a brevican és a HALPN-1, de jelen van a HA, a TN-R, a HALPN-4 (Oohashi T et al., 2015; Racz E et al., 2014; Ritok A et al., 2022). Fiziológiai szerepe valószínűsíthetően ion reservoir a glia borítás nélküli preterminalis axon szakaszokon, mellyel axonok elektromos működését támogatja.

(5) A KIR fehérállomány kötegeiben jól megfigyelhetők, immunhisztokémiai jelölés mellett, az axonkötegek mentén periodikusan megjelenő csomók, melyek a nodalis ECM akkumulációk. Ezek a Ranvier-féle befűződésekben felhalmozott, magas lectican és link protein tartalmú mikrokompartmentek. Szerepük a saltatoricus ingerületvezetéshez köthető kation reservoir (Balmer TS, 2016).

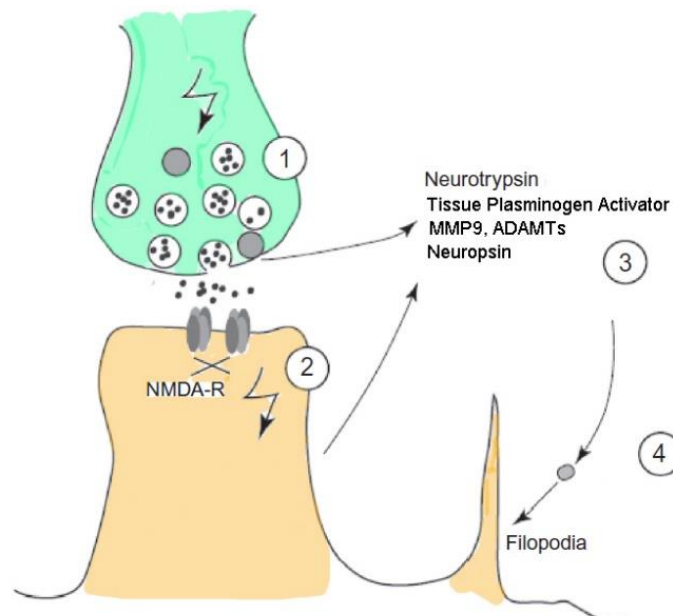
Jelen kísérletes munka a fent részletezett kompartmentekben írta le és kvantifikálta a lecticanokhoz tartozó brevican, ill. glycoprotein karakterisztikájú tenascin-R jelenlétét labyrinthus laesioval összefüggő funkcionális kompenzáció során.

## ***2.5 Synapticus plaszticitás***

Synapticus plaszticitás alatt az ingerületátvitel erősségének és hatékonyságának módosulását értjük kémiai synapsisokban. Fiziológiás ingerkörnyezetben igen tág határok

között képes adaptálni a neuronhálózatok működését. E mechanizmus a tanulás és felejtés, tapasztaltszerzés neurobiológiai alapja, azonban éppúgy megjelenik kóros működés során, neuropsychiátriai zavarokban, ill. érkatasztrófák után, traumás agyi sérülések, valamint érzékszervi deafferentációk következményeként (Michaluk P and Kaczmarek L, 2007). Bizonyított, hogy ezen szerteágazó etiológiájú agyi eseményekben közös jelenség a PNN-k összetételének átmeneti vagy végleges módosulása.

Az elmúlt mintegy két évtizedben vált bizonyítottá az extracellularis (EC) proteázok jelentősége a synapticus plasztikus adaptációkban, melyek közé sorolhatjuk a vestibularis kompenzációt is. Az EC terekben proteolyticus enzimek végzik az ECM tengelyfehérjéinek és azok membránkött receptorainak hasítását (Chaturvedi M and Kaczmarek L, 2014). Mintegy féltucat proteáz enzim aktív jelenléte nyert bizonyítást az idegrendszeri EC terekben, pl. a neurotrypsin, neuropsin, szöveti plasminogen aktivátor és a matrix metalloproteázok (MMP), ezen utóbbiak között elsősorban a MMP9 jelenléte ismert a KIR-ben, ill. kérdőjeles bizonyossággal az MMP2. Funkcionális leírások, knock-out modellek, expressziós, ill. enzim aktivitás- és gátlás vizsgálatok bizonyították az EC enzimek szerepét a synapsisok plasztikus változásai során (Tsilibary E et al., 2014) (**10. ábra**).



**10. ábra. A perisynapticus makromolekulák, köztük az ECM, enzimatis hasítása a synapticus plaszticitás feltétele.** (1.) presynapticus (theta) ingerlés erősségétől függően ürül a presynapticus membránból neurotrypsinogen. (2.) aktiválása a postsynapticus membrán NMDA receptor aktiválásától függ. Ha aktiválódik, extracellularis proteázok (MMP9, ADAMT-k, tissue Plaminogen Activator, neuropsin) ürülnek a perisynapticus térbe. (3.) Ezek egyrészt aktiválják a neurotrypsin, mely hasítja az agrint, és annak 22kDa terméke a dendriticus filopodium (4.) megjelenését promotálja. Másrészt, a perisynapticus CSPG-okat is hasítják, így a pre- és postsynapticus compartmentek morfofunkcionális adaptációjához teremtenek permisszív környezetet. **Tissue Plasminogen Activator:** véralvadék oldó proteáz, mely synapticus plaszticitásban is részt vesz LTP során. **ADAMT:** a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs. CSPG hasító exopeptidáz. **Neuropsin:** NMDA receptor aktiválástól függő szerin proteáz. LTP során fibronectint hasít. **Forrás:** módosítva Tsilibary E, et al., (2014)

Az MMP9 egy cink- és kalcium-dependens endopeptidáz. Kísérletes körülmények között aktivitása zselatin bontó tulajdonságán keresztül kvantifikálható. Természetes közegében szubsztátjai között megemlíthetők a IV. típusú kollagén, perisynapticus makromolekulák, többek között a proteoglycanok core protein szakaszai, synapticus-, transsynapticus proteinek, növekedési faktorok (brain derived growth factor), valamint pre- és post-synapticus sejtadhéziós molekulák ( $\beta$ -dystroglycan; neuroligin-1; sCAM-2; collapsin response mediator protein-2; nectin-3). A MMP9 a perisynapticus ECM és számos sejtadhéziós molekula hasításával, ill. növekedési faktorok felszabadításával hat a dendrit morfológiára, kiváltképp a dendrittüskék alakváltozásaira (Michaluk P et al., 2011; Nagy V et al., 2006). Aktivitása időben és térben igen szigorúan szabályozott a génexpresszió, valamint lokális extracelluláris (EC) inhibitorai (tissue inhibitors of matrixmetalloproteases, TIMP) által. Lokalizáltságát tekintve specifikusan megfigyelték glutamáterg kapcsolatok postsynapticus oldalán (Wilczynski GM et al., 2008), így feltételezhetően a plaszticitáshoz köthető változások postsynapticus eseményeiben működik közre.

Kísérletes megfigyelések szerint az amygdala serkentő neuronai körül többszöri jutalmazás után emelkedik az MMP9 aktivitása, míg averzív kezelések során adott külső TIMP1 (tissue inhibitor of MMP 1) esetén ez nem figyelhető meg (Knapska E et al., 2013).

## ***2.6 Vestibularis kompenzáció***

Az egyoldali belsőfül roncsolást követő tünetek közel kétszáz éve ismertek (Flourens 1842; Goltz, 1870; Ewald, 1982). Sejtszintű háttérét elsőként VM Bechterew vizsgálta, s az 1883-ban megjelent értekezésében részletezte, miként rendeződnek időben a karakterisztikus vestibularis tünetek egy-, illetve kétoldali perifériás egyensúlyozószervi kiesés után. E megfigyelések szolgáltatták a 'vestibularis compensatio' (Magnus, 1924) jelenség együttes sejt- és hálózati szintű megértésének alapjait. Továbbá, először ismerték fel, hogy az egyensúlyérző szervek emlősben nem regenerálhatnak, azonban a központi egyensúlyozó apparátusban lezajló igen kiterjedt adaptációs reorganizáció eredményeként állt helyre ismét a testtartás, vázizom működés, szemmozgások, táplálékfelvétel stb. Azóta a labyrinthus laesio a synapsisok funkcionális változásaink elfogadott modellje az idegtudományokban.

Kompenzációban a statikus- és dinamikus tünetek különböző időtávlatban rendeződnek: a statikus jelek mintegy 7-10 nap alatt, míg a dinamikus tünetek javulása hónapokat igényel, ám többségük a laborállat (ill. páciens) élete végéig megmaradnak. A relatíve gyors lezajlású plasztikus válasz engedi meg, többek között, a trauma által okozott perifériás dysfunkció

helyreállítását, de éppúgy életkortól függő szőrsejt pusztulást, vagy *neuritis vestibularis* utáni működőképességet.

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

Munkacsoportunk első, művi labyrinthus laesiot alkalmazó tanulmányában (Deak et al., 2012) ismertük fel, hogy a vestibularis magcsoport perineuronális hálóiban a HA és CSPG molekulacsoport átmeneti immunreaktivitás csökkenése tapasztalható. A változás időtartama mintegy 14 nap. A fenti közleményünk a CSPG-k általános markerének (*Wisteria floribunda* agglutinin - WFA) felhasználásával mutatott rá e változásokra.

Alapozva a fenti felismerésünkre céloztuk meg specifikusan a *tenascin-R* és *brevican* molekulák extracelluláris jelenlétének morfológiai analizését a vestibularis magkomplexum neuronjainak PNN-eiben a belsőfül érzékszervek műtéti roncsolását követő periódusban. Az első munkánkhoz hasonlóan 14 nap időtartamú postoperatív időszakban határoztuk meg a megfigyelési periódust.

#### Tudományos munkánk céljai:

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

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

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

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

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

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

## 4. ANYAGOK és MÓDSZEREK

### 4.1 Etikai jóváhagyás

Állatkísérleteinket a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága által áttekintett és jóváhagyott eljárás alapján végeztük, az alábbi engedélyezési számok alatt: 6/2017/DEMAB; 11/2011/DEMAB. A műtéti beavatkozásokat a Hajdú-Bihar Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Földhivatali Főosztálya kormány megbízottjának HB/06/ÉLB/2270-10/2017. számú etikai jóváhagyásával kivitelezte. A kísérletek során szigorúan törekedtünk az European Unió direktíváinak [European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC)] betartására, illetve ezzel összhangban a 'RRR elv' gyakorlására.

### 4.2 Kísérleti állatok

A brevican expresszió vizsgálata során  $n=15$ , a tenascin-R expresszió vizsgálatához  $n=12$ , és kontroll csoportként  $n=3$  felnőtt (12-14 hetes) nőstény Wistar (Charles River Laboratory; Strain Crl: WI) patkányt vontunk be a kísérletbe. A súlyuk 250 és 300g közötti volt. A patkányokat konvencionális állatházi körülmények között tartottuk állandó 22°C hőmérsékleten, korlátlan élelem és víz hozzáférés, ill. 12 órás nappali/éjszakai ciklusok mellett.

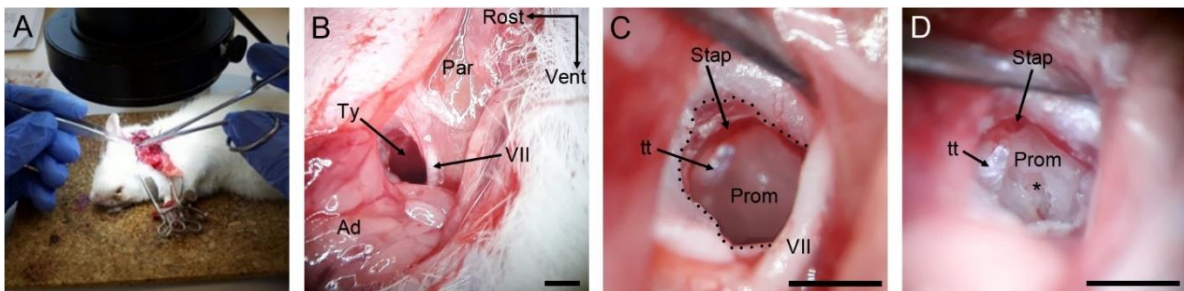
### 4.3 Unilateralis labyrinthus laesio és szövettani feldolgozás

A belső fül egyoldali roncsolását (unilateralis labyrinthus laesio – UL) általános narkózisban végeztük, mely állapotot kombinált ketamin (100mg/ttkg; Ketamin 10%, CP Pharma Handels GmbH Burgdorf, Németország) és xylazin (10mg/ttkg; Xylazine 2% Produlab Pharma BV, Raamsdonksveer, Hollandia) elegy intraperitonealis adagolásával értük el.

A műtéti metódus megtervezéséhez alapul szolgált Hitier et al., (2010) leírása, a beavatkozás pontos lépéseit azonban munkacsoportunk jelen kísérletsorozat során dolgozta ki, olyan részleteket érintve, mint a narkózist, az ér és ideg képletek roncsolás nélküli izolálását, adekvát vérzéscsillapítást, a belső fül legkevesebb melléksérüléssel járó roncsolását, ill. egyedileg elkészített műszereket.

Az UL műtétet minden esetben a kísérleti állatok bal oldalán végeztük el operáló sztereomikroszkóp (Olympus Co. Ltd., Tokyo, Japán) alatt. Postauricularis ívelt metszésből a subcutan szöveteket disszekáltuk (**11A. ábra**), a *parotis* és a *m. sternocleidomastoideus* fascia

lemezének submandibularis irányban történő eltartásakor a külső hallójárat vált láthatóvá, melynek porcos falát megnyitottuk (**11B. ábra**). Ezt követően távolítottuk el a dobhártyát és hallócsontokat, így a *cavum tympani* területét izoláltuk. A középfül medialis falán a *promontorium* áttörésével hatoltunk be a belsőfül labirintusába, ahol egy 45 fokban bevezetett hajlított manipulátorral roncsoltuk el az egyensúlyozó érzékszervet (**11C, D ábrák**). A beavatkozás során nagy figyelmet fordítottunk a *nervus facialis* és *arteria stapedia* sértetlenségére. Előbbi sérülése az állat táplálkozási és pislogási képességét korlátozza, utóbbi sérülése lethális vérzés veszélyét rejti. A roncsolt belső fül üregét steril vércsillapító Nu-Knit Tabotamp darabbal töltöttük ki (Ethicon SARL, Neuchatel, Svájc). A sebet több rétegben, nem felszívódó öltésekkel rekonstruáltuk.



**11. ábra.** Az unilateralis labyrinthectomia lépései. **A:** a postauricularis metszés kivitelezése; **B:** a cavum tympani felkeresése, a n. facialis izolálása; **C:** a cavum tympani feltárása, a promontorium és az a. stapedia felkeresése; **D:** a promontorium csontos falának áttörése. **Par.:** protis; **Ty:** cavum tympani; **Ad:** corpus adiposum buccae; **VII:** nervus facialis; **Stap:** arteria stapedia; **tt:** m. tensor tympani; **Prom:** promontorium; **Rost:** rostralis; **Vent:** ventralis. **Forrás:** saját anyagunk.

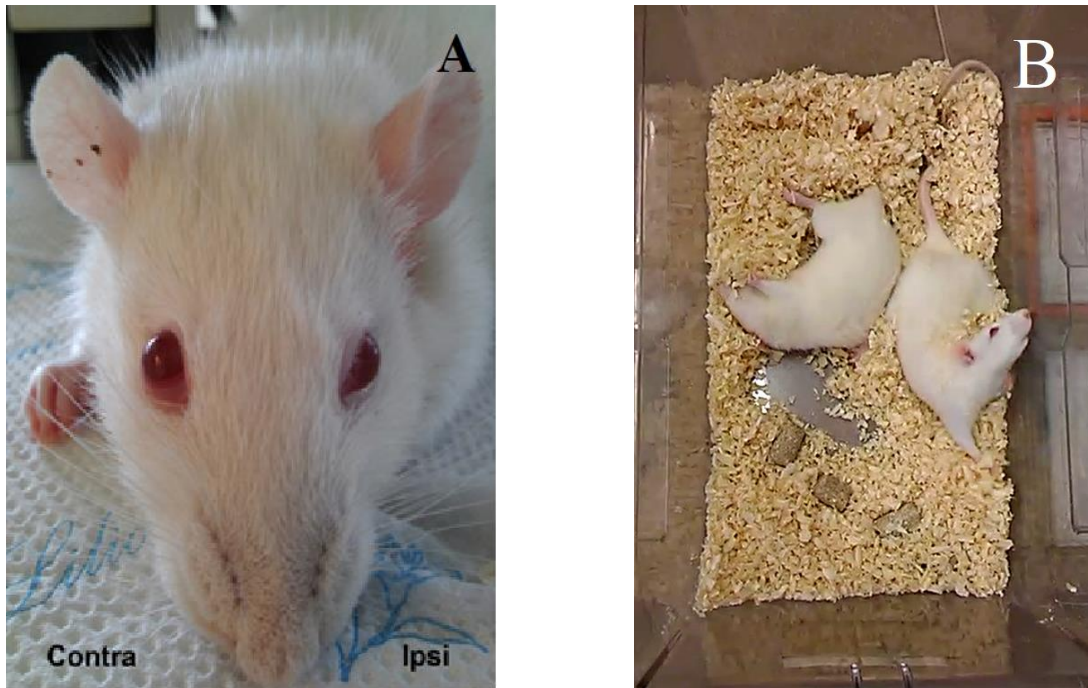
A korai postoperatív időszakban az állatok viselkedésében statikus és dinamikus vestibularis kiesési tüneteket figyeltünk meg, melyek az obszervációs idő során fokozatosan regrediáltak (**12. ábra**). Kizárólag azokat az egyedeket tartottuk kísérletben, amelyek a Günther et al., (2015) szerint felsorolt műtéti szövődményekről mentesek voltak<sup>1</sup>, valamint laesios tüneteik a nevezett közlemény pontrendszer szerint 9-10 pontra értékelhetők közvetlenül az ébredésükkor<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> 20%< súlyvesztés; cornea fekélyessége; vérző dobüreg; hemiataxia, paresis.

<sup>2</sup> -spontán nystagmus 60 ütés/perc: 6-10 pont

-fej spontán elfordítása állkapocs síkja és a vízszintes közötti szög 90°: 10 pont.

-testtartási eltérések: spontán hengergő: 10 pont; provokált hengergő: 9 pont; fekvő helyzet a sérült oldalon, lábtámasz nélkül: 8 pont; gyenge ipsilaterális lábtámasz: 7 pont; az egyik oldalon való mozgás vagy ipsilaterális láb használata fekvő helyzetben: 6 pont; kétoldali lábtámasz: 5 pont; elesés az ipsilaterális oldalra: 4 pont; az ipsilaterális oldal felé dőlve mozog: 3 pont; alig észrevehető aszimmetria: 2 pont; csak felvételkor észrevehető testtartási aszimmetria: 1 pont;



12. ábra a vestibularis laesio tünetei: **A:** eltérő szentengely állás, **B:** ipsilateralis oldalsó fej és testtartás.  
 Forrás: saját anyagunkból.

Az operált állatokat a postoperatív **első, harmadik, hetedik és tizennegyedik** túlélési napokon termináltuk, transcardialisan fiziológias sóoldattal perfundáltuk, majd agytörzseiket Sainte Marie (99% jégacet, 1% abszolút ethanol) fixálóba merítettük 24 órára. Ezt követően az agytörzseiket paraffinba ágyasztuk, majd azokból 8µm vastagságban keresztmetszeteket készítettünk az agytörzsi vestibularis magkomplexum magasságában.

Kontroll csoportként áloperált egyedeket vontunk be a kísérletsorozatba, amelyeken a fent részletezett műtétet csak a dobüreg feltárásáig folytattuk. Az áloperált egyedek megfigyelésére a megelőző műtétsorozatunkban került sor (Deak A et al., 2012). Azoknál tünetmentes postoperatív szakaszt figyeltünk meg, melyet jelen kísérletsorozatban is érvényesnek tekintettünk. E megfontolás az állatkísérleti engedély egyedszám csökkentési alapelveinek is eleget tett, a mintavételi sejttség és az analízis statisztikai erejének csökkenése nélkül.

#### 4.4 Immunhisztokémia

A szilanizált tárgylemezen elhelyezett metszetetek deparaffináltuk, rehidráltuk, majd a további immunhisztokémiai reakciók eredményessége végett gátoltuk a szöveti endogén

peroxidáz aktivitását desztillált vízben oldott 3%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oldattal szobahőmérsékleten 10 percig.

#### 4.4.1 Tenascin-R immunhisztokémiai kimutatása

A tenascin-R kimutatására használt metszeteken, ezt követően, a nem specifikus kötőhelyek blokkolását végeztük foszfát puffer fiziológiás sóoldatában (PBS) (pH 7.4) feloldott 1% szarvasmarha szérum albumin (BSA) + 10% normál nyúl szérum (NRS) elegyében.

A tenascin-R specifikus lokális expressziójának megfigyeléséhez mind a kontroll, mind pedig az operált állatok szövetein kecskében termelt poliklonális anti-tenascin-R IgG (1:300; AF3865, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) primer antiszérumot alkalmaztunk. Az inkubáció 4°C-on, egy éjszakán át zajlott, PBS-ben hígítva 1% BSA + 3% NRS jelenlétében. Többszöri PBS mosás után a másodlagos, nyúlban termelt biotinilált anti-kecske IgG antitesttel (BA-5000; 1:1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) inkubáltuk a metszeteket szobahőn, 60 percig. Az immunreakció vizualizációjához a mintákat PBS-ben hígított extrAvidin peroxidáz complexben (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) inkubáltuk 60 percig szobahőmérsékleten, melyet Tris puffer (pH 7.6) közegben H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal aktivált 3,3'-diaminobenzidin-tetrahidroklorid (DAB; Sigma-Aldrich) vizualizáció követett. Dehidráció után a metszeteket DPX (Sigma-Aldrich) fedőközeggel borítottuk. A képeket Nikon Eclipse E800 hagyományos fénymikroszkóp segítségével készítettük (Nikon Corporation, Tokyo, Japán). A felvételek, a kiértékelhetőség érdekében, azonos optikai, ill. szoftver beállítások alkalmazásával készültek. A képek tablóvá szerkesztését Photoshop CS4 v11.0 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) segítségével végeztük.

#### 4.4.2 Brevican immunhisztokémiai kimutatása

A brevican immunhisztokémiai kimutathatóságát nehezíti a tengelyfehérje, mint antigén, korlátozott hozzáférhetősége a molekuláris matrix komplexitása miatt, ezért blokkolás előtt, a brevican kimutatására használt metszeteket chondroitinase-ABC (1:100; 0,02 U / ml; Sigma-Aldrich) enzimátikus emésztésnek vetettük alá Tris-Na-acetát pufferben, pH 8.0, 60 perc, 37 °C-on.

A brevican specifikus lokális expressziójának megfigyeléséhez mind a kontroll, mind pedig az operált állatok szövetein kettős immunfluorescens jelölést végeztünk szekvenciálisan:

(I) A nem specifikus kötőhelyeket blokkolása PBS-ben (pH 7.4) oldott 1% BSA + 10% normál szarvasmarha szérumban (NDS) történt, majd nyúlban termelt poliklonális **anti-neuN**

(1:1000; ABN78, Merck Millipore, Temecula, CA, USA) antitestet alkalmaztunk PBS-ben hígítva 1% BSA + 3% NDS-mal, 4°C-on, egy éjszakán át. A reakció vizualizációja számarban termelt anti-nyúl IgG **AlexaFluor 488** (1:1000; **A27034**, Life Technologies, Eugene, Oregon, USA) konjugált fluorescens szekunder antitesttel történt PBS-ben hígítva, szobahőmérsékleten 60 perc inkubációban.

(II) Brevican immunhisztokémiai jelölését blokkolás előzte meg PBS-ben (pH 7.4) feloldott 1% BSA + 10% normál ló szérum (NHS) elegyében, szobahőmérsékleten 60 percig, majd egérben termelt monoklonális **anti-brevican** (1:200; 610894, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) antitestet alkalmaztunk PBS-ben hígítva 1% BSA + 3% NHS jelenlétében, 4°C-on, egy éjszakán át. A reakció vizualizációját másodlagos és harmadlagos inkubálással végeztük, a lóban termelt anti-egér IgG biotinilált szekunder antitesttel (1:1000; BA-5000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), melyet követett a **StreptAvidin AlexaFluor 555** (1:1000; Life Technologies) konjugált harmadlagos reagens.

Valamennyi metszetet Prolong® Diamond Antifade Mountant (Life Technologies) fedőközeggel borítottunk.

A fluorescens képeket Olympus DP74 kamerával felszerelt Olympus CX31 epifluoreszcens mikroszkóppal rögzítettük (Olympus Ltd., Tokyo, Japán). A felvételek mindegyike a mikroszkóp azonos szoftveres és hardveres beállítása mellett készült. Az így megkapott digitális képeken kvantitatív elemzést egy harmadik kísérletező végezte el. A PNN-ek kvantitatív elemzéséhez az ImageJ v1.46 (National Institute of Health, Bethesda, MA, USA) szoftvert alkalmaztuk. A PNN-val borított neuronok mennyiségi meghatározását a CellSense Dimension v2.3 (Olympus) szoftverrel készítettük manuálisan. A diagrammok összeállítását, valamint a kontraszt optimalizálását az Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) szoftverrel végeztük.

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

A tenascin-R expresszió különbségeit az egyes postoperatív stádiumokban a mikroszkópos felvételek szemikvantitatív értékelésével rangsoroltuk. Mind a négy vestibularis magból azonos metszési magasságában, stádiumonként három-három egyedből vettünk metszeteket. A megegyező beállítások (fényerő, kontraszt, nagyítás) alkalmazásával készült fénymikroszkópos felvételeket ezután két kutató független megítélése alapján kvantifikáltuk, értékelésüket pedig egy harmadik személy ellenőrizte. A reakció intenzitást négyfokozatú

skálán határoztuk meg: (-) nincs festődés; (+) gyenge festődés; (++) mérsékelt festődés; (+++) erős festődés. A kontroll szemikvantitatív denzitásértékeknek a Ráczi et al., (2014) közleményünkben közölt operálatlan patkányok alapértékeit tekintettük.

A szemikvantitatív értékelés során a festési intenzitás besorolási skálájának grádusai között nem lehetett objektív „távolságot” megállapítani, így a kapott adatokat ordiális változóknak tekintettük, amelyek lehetővé teszik a nem paraméteres statisztikai elemzés alkalmazását. Ezek alapján két különböző hipotézist teszteltünk.

- (I) Az *első* statisztikai analízis során ugyanazon operált állat ipsi- és contralateralis magjaiban megállapított intenzitás értékek különbségeit elemeztük. A számítás alapjául szolgáló változóknak a három kiértékelő személy által megfigyelt intenzitásértékek mediánjait vettük. A statisztikai elemzéshez a Wilcoxon-féle előjeles rang próbát alkalmaztuk.
- (II) A *második* statisztikai analízis során azt vizsgáltuk, hogy az egyes postoperatív stádiumok (1, 3, 7, 14 nap túlélés) TN-R immunreaktivitásai között mutatkozott-e különbség az egyoldali labyrinthus laesio következményeként, melyhez Kruskal-Wallis varianciaanalízist alkalmaztunk. A postoperatív stádiumok között megfigyelt TN-R expressziós változásokat, ahol volt, Mann-Whitney-Wilcoxon próbával (U-próba) elemeztük. A különbségeket akkor tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, ha a  $p < 0,001$  volt. A statisztikai elemzéseket az SPSS 21.0 szoftverben (SPSS, Chicago, IL, USA) végeztük.

#### ***4.6 A brevican expresszió változásának kvantitatív elemzése és statisztikai értékelése***

Optikai denzitometriát használtunk a brevican reakció intenzitásának számszerűsítésére a NVS neuronjainak PNN-jeiben (Faralli A et al., 2016). Minden túlélési csoportban 3-4 patkány NVS-át kvantifikáltuk, külön az ipsi-, és contralateralis oldalak PNN-it. A NVS pozícióját és határait a Paxinos and Watson, 1998 patkány sztereotaxiás atlasz alapján határoztuk meg abban a frontális síkban, amelyben a NVS nagyméretű neuronjai legnagyobb mennyiségben megfigyelhetők. Az immunhisztokémiai jelölést követően a kvantifikálható PNN-kat szigorú szelekciós kritériumok szerint válogattuk: NeuN-brevican kettős immunfluorescens jel, szolid PNN körvonal, átmérő  $>20\mu\text{m}$ , viszont a tangenciális metszésű somákat figyelmen kívül hagytuk. Kvantifikációs célra 8-bit színmélységű monokróm felvételeket használtunk, melyeken kizárólag a PNN-t megjelölő AlexaFluor 555 fluorokrómot gerjesztettük a felvételek készítése során. Minden túlélési stádiumból (kontroll, 1, 3, 7 és 14 nap) 250-650 darab PNN-t kvantifikáltunk. A PNN-ek körülrajzolását követően az ImageJ szoftver számolta ki a kijelölt terület 'szürke átlagértékét' (mean gray value) 0-255

tartományban, amely értékeket használtunk fel a további statisztikai elemzéshez. A háttér fényerejét, amit a kisagyi *stratum moleculare* festetlen területén rögzítettünk, kivontuk a mérési értékekből. Az intenzitási adatokat a kontroll csoportként használt intakt állatok vestibularis idegsejtjeit körülölelő PNN intenzitási adataihoz normalizáltuk, majd elemeztük statisztikai összehasonlításban az egyes túlélési csoportokban és azokon belül az operált és nem operált oldalak között.

#### **4.7 Perineuronális hálók mennyiségi meghatározása**

A brevican expresszió változásával összhangban vizsgáltuk a brevican pozitív PNN-ek abszolút számának és arányának változását UL következményeként. Kiszámoltuk és statisztikailag összehasonlítottuk a brevican pozitív PNN-k által körülvevő neuronok arányát az összes NeuN pozitív sejthez képest az operált állatok ipsi- és contralateralis NVS-jében, valamint a kontroll patkányokban.

#### **4.8 A brevican expresszió változásának statisztikai elemzése**

Az optikai denzitások frekvenciaeloszlásának normalitását Shapiro-Wilk teszttel elemeztük. A varianciák egyenlőségét Brown-Forsythe teszttel ellenőriztük. UL után a PNN-kban mért brevican reakcióintenzitások változásainak szignifikanciáját az ipsi- és contralateralis NVS-ben Kruskal-Wallis egyutas variancia-analízissel (ANOVA) elemeztük. A Dunn *post-hoc* teszttel hasonlítottuk össze a különböző túlélési csoportokban mért reakció intenzitást a kontroll csoport reakció intenzitásával. A brevican pozitív PNN-k arányában észlelt postoperatív változások szignifikanciáját egyszempontos ANOVA-teszt segítségével vizsgáltuk. Optikai denzitásuk alapján a PNN-kat három csoportba soroltuk: *gyenge* (ahol a denzitás  $\leq$  a maximum 33%-a), *közepes* (ahol a denzitás  $33% <$  és  $\leq 66%$  a maximumhoz képest) és *erős* intenzitás ( $>66%$ ). A PNN-k gyenge, közepes és erős kategóriák szerinti gyakorisági eloszlását  $\chi^2$ -próbával hasonlítottuk össze a különböző túlélési és a kontroll csoportokban. Itt a kontroll és az operált állatok különböző túlélési csoportjaiban mért legmagasabb intenzitás értéket vettük 100%-nak, (ezt a maximumot kontroll állatnál detektáltuk). Az adatokat a MS Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) és a SigmaPlot for Windows v14.0 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA) szoftverekkel ábráztuk. A különbségeket akkor tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, ha a  $p < 0,001$  volt.

## 5. EREDMÉNYEK

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

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

### *Tenascin-R*

#### **5.1 Egyoldali labyrinthus laesio következményeként a Tenascin-R expresszió átmenetileg lecsökken a vestibularis magkomplexum perineuronális hálóiban és neuropilében**

Az agytörzsi vestibularis magkomplexum négy magjában írtuk le a tenascin-R immunreaktivitás átmeneti változásait, a belsőfül egyoldali műtéti laesioját követő 1., 3., 7. és 14. napokon. Összehasonlítottuk a laesio szerinti ipsi- valamint contralateralis magok

	NVS	NVL	NVM magno	NVD rostralis	NVD caudalis
<b>Hyaluronan</b>	+++	+++	+++	++	-
<b>WFA</b>	++	++	++	++++	-
<b>Aggrecan</b>	++++	++++	+++	++++	-
<b>Versican</b>	++	#	#	+	+
<b>Neurocan</b>	++	++	+	++	-
<b>Brevican</b>	++++	++++	+++	-	-
<b>Tenascin-R</b>	+++	+++	+++	+++	+
<b>HAPLN1</b>	++	+	+	++	-

**1. táblázat** Perineuronális hálók szemikvantitatív pontozása ép patkányok vestibularis magkomplexumában. A tenascin-R bekeretezett értékeit tekintettük kontroll értékeknek a jelen vizsgálat postoperatív összehasonlításai során. Szemikvantitatív értékelésekor a következő pontrendszer alkalmaztuk: -: nincs festődés, +: gyenge festődés, ++: mérsékelt festődés, +++: erős festődés, ++++: nagyon erős. #: *versican* pontozott mintázata nem ítéltető perineuronális hálónak. (jelen értekezésben irreleváns) **Forrás:** Rác et al, (2014).

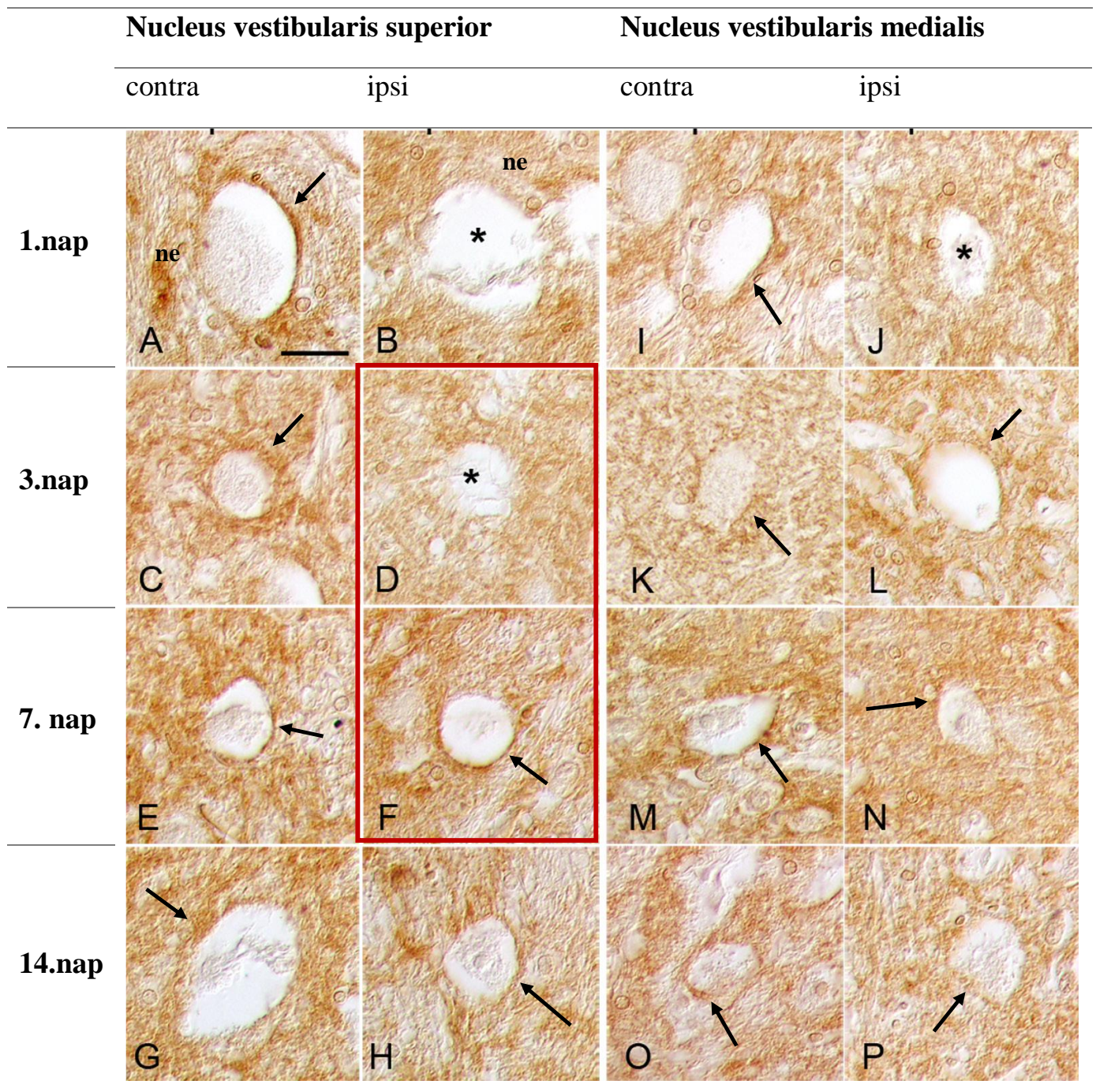
immunhisztokémiai jelintenzitásait, illetve statisztikai módszerekkel validáltuk azok szemikvantitatív értékeit, az alábbiak szerint. Megállapításainkat megalapozta laborunk korábbi leírása (Racz E et al., 2014) a vestibularis magkomplexumban megfigyelhető ECM akkumulációkról, melyeket a TN-R esetében kontroll értékeknek tekintettünk (**1. táblázat**).

#### *5.1.1 Nucleus vestibularis superior*

A NVS-ban észleltük a legdinamikusabban változó immunreaktivitást a postoperatív szakaszban (**13. ábra A-H**). Az 1. túlélési napon az operált oldali magban a somák közvetlen környezetében nem rajzolódott ki perineuronális háló, míg a PNN-k a contralateralis NVS-ban továbbra is megtartottak. A neuropil festődése nem változott, a műtött oldali az ellenoldalival megegyező intenzitást mutatott, s nem tért el az ép állatokban látott festésmintázattól sem (Racz E et al., 2014). (**13. ábra A, B; 2. táblázat**). A 3. túlélési napon, az operált oldalon, perineuronális háló az előző stádiumhoz hasonlóan nem volt kimutatható, valamint a neuropil is gyengébben festődött az ipsilateralis magban (**13. ábra: C, D**). A contralateralis oldal erősen festődő perineuronális hálója változatlan maradt a 3. napon. A műtött oldalon, a vestibularis laesio tüneteinek mérséklődésével párhuzamosan, a tenascin-R immunreaktivitás emelkedése figyelhető meg már a 7. túlélési napon, a 14. napra pedig ismét a kontroll értékek szintjére emelkedett. Mindkét túlélési csoportban (7. és 14. nap) közepes festődés (++) mutatkozott ipsilateralisan. Kiemelendő, hogy a contralateralis magban intenzívebb neuropil festődést láttunk a 7. és 14. túlélési napokon (**13. ábra E, G**).

#### *5.1.2 Nucleus vestibularis medialis*

A NVM **magnocellularis** részében a tenascin-R expressziós dinamikája több ponton mutatott eltérést a NVS-tól. Contralateralisan változatlan festési intenzitás mutatkozott a túlélés napoktól függetlenül. Ellenben, az 1. túlélési napon az ipsilateralis mag perineuronális hálóiban – a NVS-ral megegyezően – nem volt kimutatható a TN-R, tehát PNN sem ábrázolódt (**13. ábra I, J**). A 3. posztoperatív naptól a perineuronális hálók élesen elkülönültek a környező neuropiltól, ami valószínűsíti a tenascin-R expresszió emelkedését, intenzitása azonban elmaradt az époldalhoz képest (**13. ábra K, L**). A 7. és 14. napokon a perineuronális hálók immunreaktivitása közepes szintű (**2. táblázat**), jelentős eltérés az ipsi- és contralateralis értékek között nem volt leírható (**13. ábra M, N, O, P; 2. táblázat**). A neuropil festődési intenzitásában a 3., 7. és 14. napokon nem észleltünk változást (**13. ábra: L, N, P**).



**13. ábra:**Tenascin-R elleni immunhisztokémiai reakció (DAB) a nucleus vestibularis superior (NVS)(A-H), ill. a nucleus vestibularis medialis magnocellularis (NVMm) részében (I-P) az egyoldali labyrinthus laesio utáni 1., 3., 7. és 14. túlélési napokon. **fekete nyíl:** perineuronális háló. **ne:** neuropil (A, B). **ipsi:** operált oldali. **contra:** ép oldali. \*: immunhisztokémiai reakcióintenzitások csökkenése ipsilateralisan. **Lépték:** 20 $\mu$ m.

A NVS perineuronális hálóiban az 1. és 3. postop. napokon tenascin-R intenzitás csökkenés ábrázolódott (B, D). A NVMm részében csak az 1. napon csökkent tenascin-R festődés az ipsilaterális neuronok perineuronális hálóiban (J). **Piros keret:** szignifikáns változások, Mann-Whitney-Wilcoxon próba ( $p < 0,001$ ).

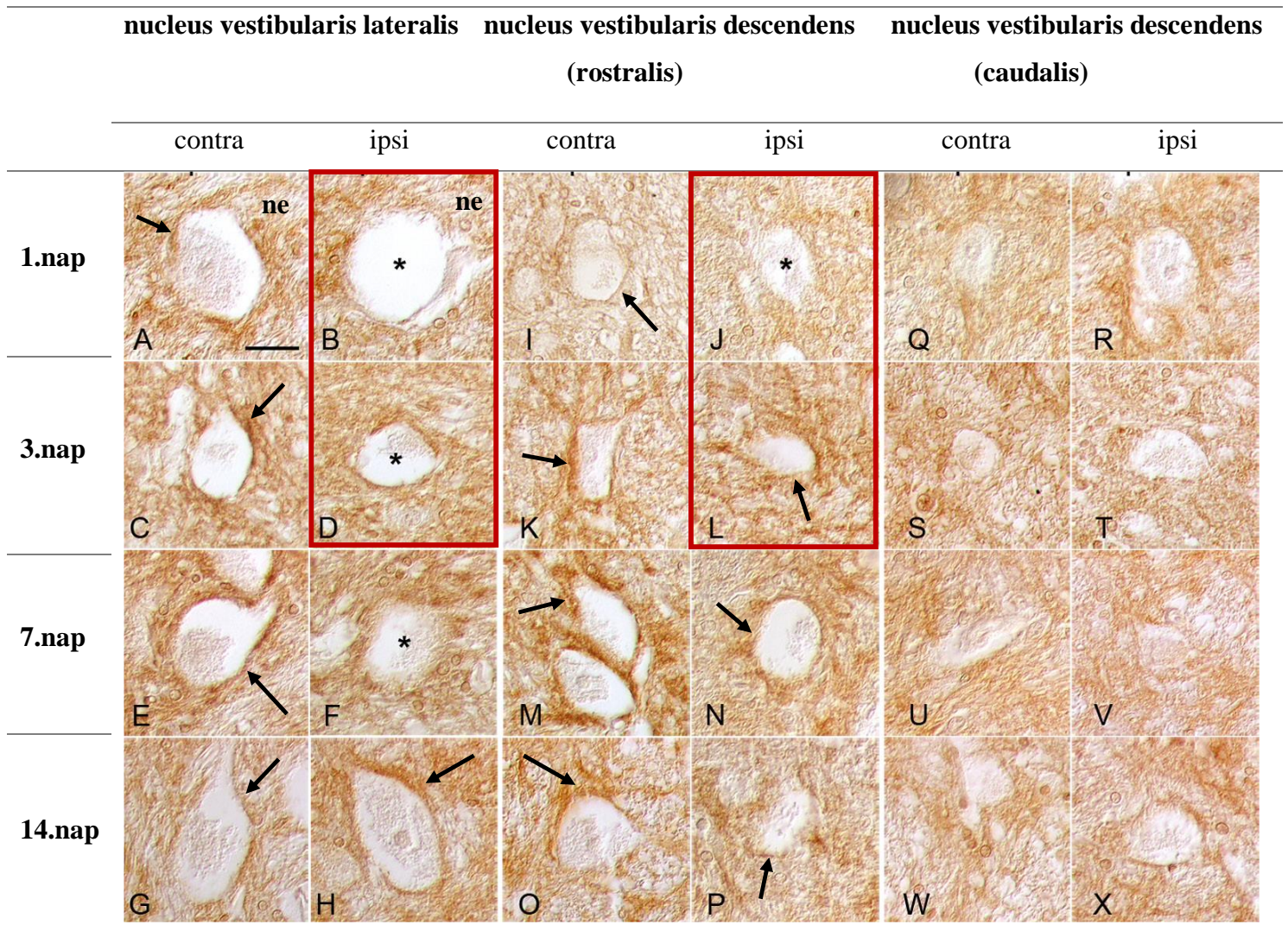
### 5.1.3 Nucleus vestibularis lateralis

A NVL-ban az operált oldali perineuronális hálókban tenascin-R, hasonlóan a NVS és NVMm-hoz, immunhisztokémiai jelöléssel nem volt detektálható az 1. postoperatív napon (**14. ábra A, B**). A 3. túlélési napon az operált oldalon közepes erősségű perineuronális hálók (**1. táblázat**) jelentek meg, festési intenzitásuk azonban az époldali szintjét nem érte el (**14. ábra C, D; 2. táblázat**). A 7. napon a festődés intenzitása nem emelkedett a 3. naphoz képest, sőt az ipsilaterális neuropilben is alacsonyabb TN-R jelenlétet írtunk le (**14. ábra E, F**). A 14. napon már nem mutatkozott eltérés az ipsi- és contralateralis NVL neuronok perineuronális hálóinak immunfestődései között, és a neuropil festődése sem mutatott eltérést az ép- és operált oldalak között (**14. ábra G, H; 2. táblázat**).

### 5.1.4 Nucleus vestibularis descendens

A **NVD rostralis** részében, az 1. postoperatív napon nem mutatkoztak a neuropiltól elváló perineuronális hálók ipsilaterálisan, a contralateralis magban viszont gyenge (+) PNN-k fedezhetők fel. (**14. ábra I, J**). A 3. postoperatív napon viszont a kontrol állatokéval megegyező reakció intenzitást láthattunk mindkét oldali vestibularis magban (**14. ábra K, L**). A 7. postoperatív napon hasonló PNN és neuropil festési intenzitás volt megfigyelhető a 3. napon mért értékekkel, ám az operált oldalon egy '+'-tel alacsonyabb intenzitást láttunk (**14. ábra M, N; 2. táblázat**). Meglepetésünkre, a 14. napon egy értékkel gyengébb immunjelölést láttunk az ipsilaterális mag perineuronális hálóiban, míg contralateralisan a kontrollnak megfelelő PNN intenzitás mutatkozott (**14. ábra O, P**).

A **NVD caudalis** részében perineuronális hálókat ép állatokban sem láttunk (Ráczy et al., 2014). A neuropil immunreaktivitása a UL-t követő túlélési időpontokban nem mutatott eltérést az ép állatokban (**1. táblázat**) leírt morfológiától (**14. ábra Q-X**).



**14. ábra.** Tenascin-R elleni immunhisztokémiai reakció (DAB) a nucleus vestibularis lateralis (NVL)(A-H), ill. a nucleus vestibularis descendens rostralis (NVDr)(I-P) és caudalis (NVDC)(Q-X) részeiben egyoldali labyrinthus laesio utáni 1., 3., 7. és 14. túlélési napokon. **fekete nyíl:** perineuronális háló. **ne:** neuropil (A, B). **ipsi:** operált oldali. **contra:** ép oldali. \*: immunhisztokémiai reakcióintenzitások csökkenése ipsilateralisan. **Piros keret:** szignifikáns változások, Mann-Whitney-Wilcoxon próba ( $p < 0,001$ ). **Lépték:** 20 $\mu$ m

A NVL perineuronális hálójában az 1., 3. és 7. postop. napon tenascin-R intenzitáscsökkenés ábrázolódott (B, D, F). A NVDr részében a tenascin-R immunogenitás esése csak az operált oldalon az 1. postop. napon volt látható (J). A NVDC-ban nem tért el a két oldal festésintenzitása egyik túlélési csoportban sem.

	nucleus vestibularis superior		nucleus vestibularis medialis		nucleus vestibularis lateralis		nucleus vestibularis descendens rostralis	
	contra	ipsi	contra	ipsi	contra	ipsi	contra	ipsi
	<b>1.nap</b>	+++	-	++	-	+++	-/+	+
<b>3.nap</b>	+++	-	++	+	+++	++	++	++
<b>7.nap</b>	+++	++	++	+	++	+ / +++	+++	++
<b>14.nap</b>	++	++	++	+	++	++	++	+

**2. táblázat. Tenascin-R elleni immunhisztokémiai reakció szemikvantitatív értékelése a vestibularis magkomplexum perineuronális hálóiban, egyoldali labyrinthus laesiot követő 1., 3., 7. és 14. napokon.**

A tenascin-R immunhisztokémiai festésintenzitás szemikvantitatív értékelésekor a következő pontrendszert alkalmaztuk: -: nincs festődés, +: gyenge festődés, ++: mérsékelt festődés, +++: erős festődés. **Piros keret:** szignifikáns változások, Mann-Whitney-Wilcoxon próba ( $p < 0,001$ ).

## 5.2 Tenascin-R szemikvantitatív intenzitásértékeinek statisztikai analízise

Statisztikai összevetésben szignifikáns különbség mutatkozott a NVS-ban a 3. és 7. túlélési napok szemikvantitatív intenzitás értékei között ( $p < 0,001$ ), míg az 1. és 3. napok, valamint a 7. és 14. értékeinek összevetésében statisztikai szignifikancia nem nyert bizonyosságot.

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

A NVL és NVD rostralis részében a intenzitás-változás csak az 1. és 3. napok között mutatkozott szignifikánsnak ( $p < 0,001$ ), a további túlélési napok intenzitás értékei között ez nem volt bizonyítható (1-2. táblázatok).

## ***Brevican***

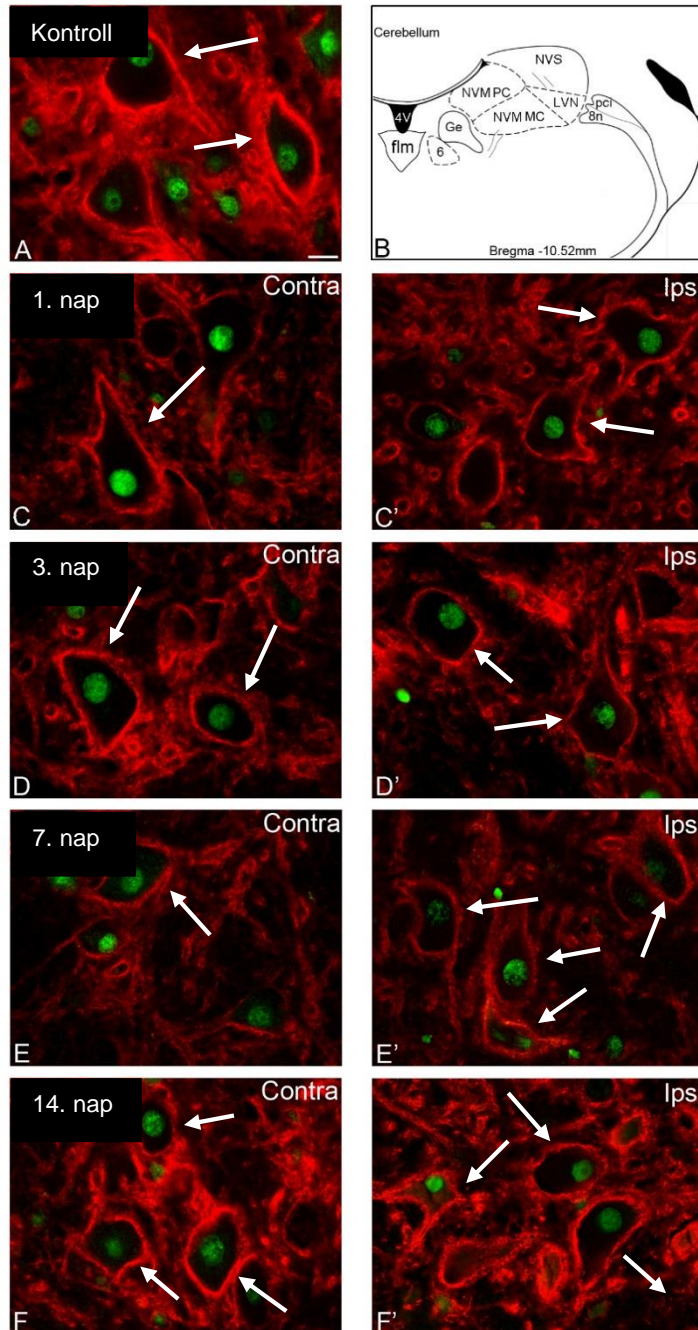
Munkacsoportunk korábbi tanulmányában részletesen bemutatta a vestibularis magok PNN-jében jellemző ECM molekulák összetételét (Racz et al., 2014). Megfigyelésünk szerint erős brevican elleni immunreaktivitás volt kimutatható a NVS neuronjainak perineuronális hálóiiban és a mag teljes területén.

### ***5.3 Labyrinthus laesio következményeként a NVS perineuronális hálói tranziens morfológiai változást mutatnak***

A kontroll állatokban (**15. ábra A**) a brevican pozitív PNN-val bíró és PNN-val nem borított neuronok száma hasonló volt (**16. ábra CTR**). Az NVS neuronjainak közel felét (47,9%) brevican immunreaktív pericelluláris ECM vette körül. UL-t követően, az 1. postop. napon mindkét oldali NVS-ben csökkent a brevican pozitív PNN-k aránya és a festődés intenzitása (**15. ábra C, C'**), habár az észlelt csökkenés nem mutatott szignifikáns különbséget a két oldal között. A brevican immunreaktivitás bilaterálisan emelkedett a 3. postoperatív napig (**15. ábra D, D'**). A 7. postoperatív napra a PNN-kban a brevican reakció intenzitása ismét csökkent mindkét oldali magban a korábbi túlélési csoportokhoz viszonyítva (**15. ábra E, E'**). A műtét utáni 14. napra a brevican elleni immunreakció mindkét oldalon a kontroll értékekkel megegyező intenzitásúra tért vissza (**15. ábra F, F'**).

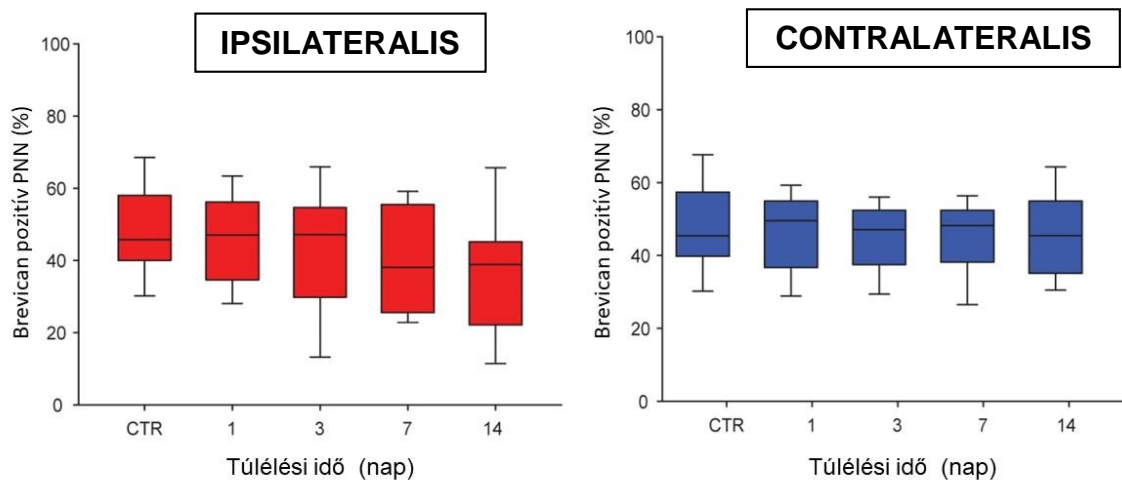
### ***5.4 Labyrinthus laesio hatása a perineuronális hálóval fedett neuronok részarányára a NVS-ban***

A részletes analízis során megfigyeltük, hogy nemcsak a brevican immunfestődési intenzitása mutatott változást a postoperatív napok függvényében, hanem szimultán a brevican pozitív PNN-val bíró neuronok aránya is némileg változott (**16. ábra**). A kontroll csoportban az idegsejtek csaknem felét (47,9%) vette körül a brevicant tartalmazó



15. ábra. Neuronok (anti-NeuN: **zöld**) és a perineuronális hálók (anti-brevican; **piros**) kettős immunfluoreszcens jelölése a nucleus vestibularis superiorban (NVS). Ép patkányban (A) jellemző brevican intenzitást tekintettünk kontroll értéknek. Szövetani elemzések során a NVS helyzetét (B) Paxinos és Watson, 1998 patkány agy sztereotaxiás atlasza alapján határoztuk meg. Az egyoldali labyrinthus laesio következményeként lecsökkent a brevican immunreaktivitás a NVS neuronjainak perineuronális hálójában. Csökkenés az 1. (C, C'), a 3. (D, D') és a 7. (E, E') postoperatív napon észleltük az ipsi- és a contralateralis oldalon. A 14. napra a brevican expresszió az ép állatokéval egyezett meg (F, F'). **4V**: IV. agykamra, **flm**: fasciculus longitudinalis medialis, **6**: nucleus n. abducentis, **Ge**: geniculum internum n. VII., **pci**: pedunculus cerebellaris inferior, **8n**: n. vestibularis, **NVM MC**: nucleus vestibularis medialis magnocellularis osztata; **NVM PC**: nucleus vestibularis medialis parvocellularis osztata; **NVL**: nucleus vestibularis lateralis; **fehér nyíl**: perineuronális hálók, Lépték: 20 $\mu$ m.

perisomatic ECM. UL-t követő postoperatív napok függvényében minimális változásokat figyeltünk meg a brevican pozitív PNN-val fedett idegsejtek százalékos arányában, de ezek a változások nem voltak szignifikánsak. Az operált oldalon (**16. ábra IPSILATERALIS**) a laesio utáni 1. és 3. napon a NVS neuronjainak átlagosan 44%-t borította brevican pozitív PNN. Ez az átlag érték a 7. napon 43%, a 14. napon 39% volt.



**16. ábra.** Egyoldali labyrinthus laesio hatása a perineuronális hálóval borított neuronok részarányára az ipsi- és a contralateralis nucleus vestibularis superiorban. A műtét utáni 1.-14. napokon nem mutatkozott szignifikáns változás a PNN-val borított neuronok arányában sem az ipsi- (piros), sem a contralateralis (kék) NVS-okban. Egyutas variancia-analízis,  $p=0,188$  (ipsilat.) és  $p=0,954$  (kontralat.). A boxok alsó és felső határértékei 25. és 75. percentiliseket jelölik; osztóvonalaik a medián értéket jelölik; az dobozok alatti és fölött oszlopok pedig a 10. és 90. percentiliseket jelölik. **CTR:** kontroll érték ép patkány NVS-ában.

Az ellenoldalon (**16. ábra**) is az operált oldali értékhez közelítő átlagértékeket kaptunk, az 1. és 3. napos túlélési csoport esetén a vizsgált neuronok 45%-t borította brevican pozitív PNN, a 7. napon 42%-t, a 14. napon 46%-t.

### **5.5 UL-t követően átmenetileg megváltozott a brevican-pozitív perineuronális hálók részaránya az erős-közepes-gyenge osztályok között.**

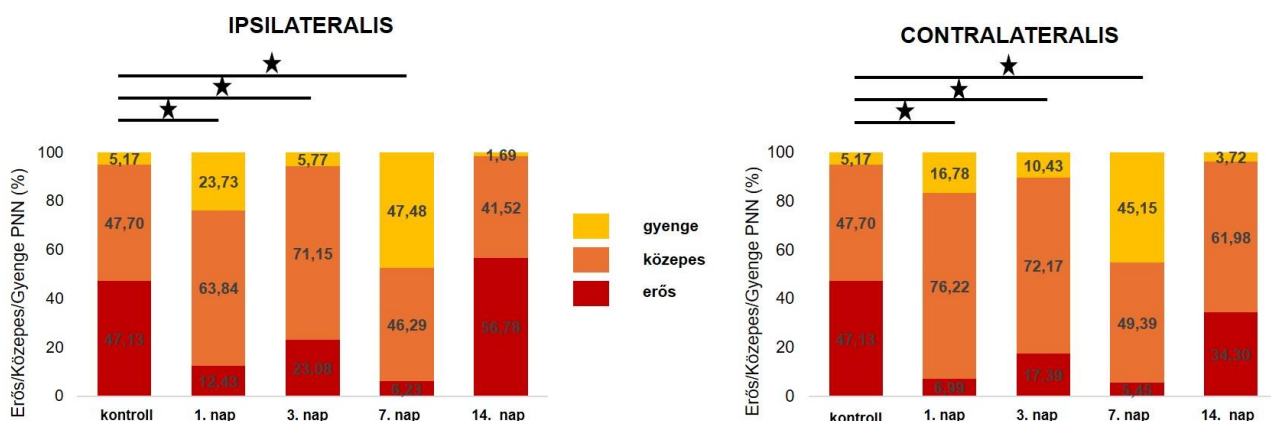
A brevican elleni immunreaktivitás fluoreszcencia-intenzitásából számolt optikai denzitometriai értékek alapján a perineuronális hálókat a következők szerint soroltuk osztályokba (**17. ábra**):

- 0-33% gyenge,
- 33,1-66% közepes,
- 66,1%-100% erős.

Kontroll állatokban a PNN-k festődési intenzitás eloszlása alapján a brevican pozitív PNN-ek többsége az *erős* (47,13%) és a *közepes* (47,70%) kategóriába esett, csak 5,17% -uk volt a *gyengén* festődő.

A festődési intenzitás csökkenése átmenetinek bizonyult a műtétet követő 7. napig tartott, ipsi- és contralateralisan egyaránt. Eredményeképpen jelentősen megváltozott az erős-, közepes- és gyenge immunfestődésű PNN-k aránya a kontroll állatok megoszlásával összevetve (szignifikáns változásokat csillaggal jelöltük).

- **Operált oldal (ipsilateralis):** az 1. postop. napon az *erős* immunfestődésű PNN-k aránya igen radikálisan lecsökkent, mindössze 12,43%, a 3. napon a 23,08%, a 7. napon pedig 6,23% volt. A *közepes* festődési intenzitást mutató PNN-k aránya jelentősen, mintegy 50%-kal megemelkedett a kontroll értékekhez képest; részarányuk az 1. postop. napon 63,84%, a 3. napon 71,15%, a 7. napon 46,29% volt. *Gyenge* festődésű PNN-k aránya is jelentősen megemelkedett, részarányuk az 1. napon 23,73%, a 3. napon 5,77%, a 7. napon 47,48%. Szignifikancia az 1., a 3. és a 7. műtétet követő napokon ( $\chi^2$  teszt,  $\chi^2(2, n=156 - 337) = 21,05 - 157,36, p<0.001$ ) ipsilateralisan.
- **Ép oldal (contralateralis):** az operált oldali PNN-hoz hasonlóan radikális eltolódás mutatkozott az expressziós mintázatban. *Erős* festődést mutatott a PNN-k 6,99%-a az 1. napon, a 3. napon 17,39%, a 7. napon 5,45%, mely értékek igen erős esést reprezentálnak a kontroll állatokéval összehasonlítva. A *közepes* festésintenzitású PNN-k az 1. napon 76,22%, a 3. napon 72,17%-ban, a 7. napon 49,39%-ban voltak jelen. A *gyengén* festődő PNN-k arányai is igen erős növekedést mutattak, az 1. napon 16,78%, a 3. napon 10,43%, a 7. napon 45,15% -t tettek ki a PNN-val borított neuronok között. Szignifikancia az 1., a 3. és a 7. műtétet követő napokon  $\chi^2(2, n=143 - 330)=41,99 - 157,87; p<0.001$ ) contralateralisan.

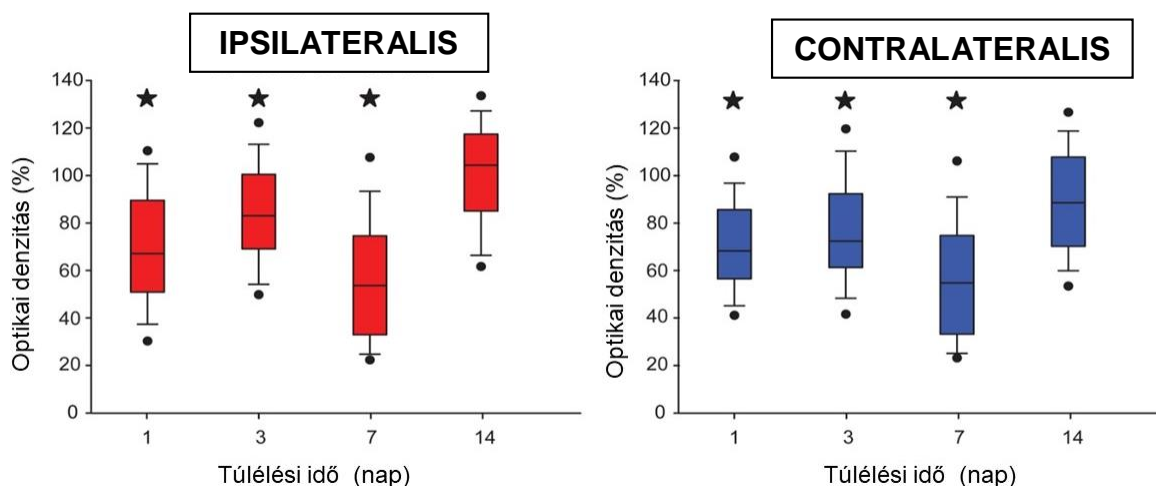


**17.ábra: Labyrinthus laesio hatása az erős-, közepes- és gyenge immunfestődésű perineuronális hálók megoszlására a nucleus vestibularis superiorban.** UL hatására az erős-, közepes- és gyenge optikai denzitású perineuronális hálók arányai a postoperatív szakban átmenetileg átrendeződtek. E hatás a 7. posztop. napig mutatkozott szignifikánsnak: ( $\chi^2$  teszt,  $p < 0,001$ ), mind ipsi- és contralateralisan. A 14. napon csak a contralateralis magban kaptunk szignifikáns eltérést ( $\chi^2$  teszt,  $p = 0,015$ ), ipsilateralisan immár nem ( $\chi^2$  teszt,  $p = 0,127$ ). A vártnál nagyobb hasonlóság mutatkozott a kontroll és 14. napon vett minták arányai között, így a  $\chi^2$  teszt statisztikai ereje a 0,8 határérték alá esett annak ellenére, hogy a mintaszámaink (292 ipsi- és 416 contralat.) messze felülmúlták a statisztikai próbák minimum elvárásait. Az említett esés a szignifikancia statisztikai megerősítését korlátozta. A statisztikai erő teszt befolyásolatlan maradt.

A 14. napon a perineuronális hálók optikai denzitás értékei mindkét oldalon a kontroll csoportot megközelítő megoszlást mutattak. Az operált oldalon *erősen* festődött a brevican pozitív PNN-ek 56,78%-a, *közepesen* 41,52%, és *gyengén* 1,69%. Az ellenoldalon ugyanezen értékek 34,30%, 61,98% és 3,72%. Szignifikancia a 14. műtétet követő napon:  $\chi^2$  teszt,  $\chi^2(2, n=174$  és  $118)=4,14$ ,  $p=0,127$  ipsilateralisan;  $\chi^2(2, n=174$  és  $242)=8,38$ ,  $p=0,015$  contralateralisan.

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

A morfológiai megfigyeléseinket (15. és 18. ábrák) igazolták az optikai denzitometriai mérések átlagértékei. Az ép patkányok NVS-ában mért denzitometriai átlag értékeket tekintettük kontrollként (100%), melyhez viszonyítottuk az egyes túlélési csoportokban regisztrált denzitometriai értékek átlagát.



**18. ábra: Egyoldali labirintus laesio következményeként a perineuronális hálók (PNN) átlagos optikai denzitás értékeinek átmeneti változásai a nucleus vestibularis superiorban.** Az operált állatok perineuronális hálóinak átlagos optikai denzitás- értékeit ép állatokból vett kontroll értékhez (100%) normalizáltuk. A box polt-ok határértékei a 10., 25., 50., 75. és 90. percentiliseket jelölik, az alsó- és felső pontok az 5. és 95. percentiliseket. Optikai denzitásértékek a laesiot követő 1., 3. és 7. napokon mutatkoztak szignifikánsan (★) alacsonyabbnak (Dunn-féle *post hoc* próba,  $p < 0,001$ ), ugyanúgy ipsi- (piros box) és contralateralisan (kék box)(Kruskal-Wallis variancia analízis,  $p < 0,001$ ). A 14. napon ismét a kontroll értékekkel egyezett meg (Dunn-féle *post hoc* próba,  $p > 0,999$  (ipsilateralis) és  $p = 0,024$  (contralateralis)).

Az UL utáni 1. napon a denzitometriai átlag értékek radikális esését láttuk mindkét oldalon, 69,97%-os értéket az operált oldalon és 70,30%-t az ép oldalon (18. ábra, 3. táblázat). A PNN-ek immunreaktivitása bilaterálisan emelkedett a túlélés 3. napjáig, az operált oldalon 83,96% és 76,78% az ép oldalon. A 7. napon mért átlagértékek a kontroll csoportok értékeinek felére csökkentek (56,30% az operált oldalon és 56,38% az intakt oldali magban). A 14. napon az operált oldal átlagértékei a kontroll érték szintjére emelkedtek, 100,65%-ra, ellenoldalon pedig 89,44%-ra.

Túlélési idő	IPSILATERALIS				CONTRALATERALIS			
	Vizsgált neuronok száma (n)	szórás	standard hiba	Átlag (%)	Vizsgált neuronok száma (n)	szórás	standard hiba	Átlag (%)
CTR	174	26,91	2,04	100	174	26,91	2,04	100
1. nap	177	24,19	1,81	69,97	143	19,70	1,64	70,30
3. nap	156	21,86	1,75	83,96	230	23,86	1,57	76,78
7. nap	337	26,20	1,42	56,30	330	25,84	1,42	56,38
14. nap	118	22,76	2,09	100,65	242	23,04	1,48	89,44

**3. táblázat. Átlagos optikai denzitásértékek labirintus laesio-t követően a ipsi- és contralateralis nucleus vestibularis superiorban.**

A statisztikai elemzés szerint az operált- és époldali NVS-ban szignifikáns optikai denzitás változás mutatkozott a laesio következményeként (Kruskal-Wallis egyutas ANOVA és Ranks teszt,  $H_{(4)}=329,20$ ,  $p<0.001$  (ipsilateralis) és  $H_{(4)}=317,27$ ,  $p<0.001$  (contralateralis) (elemszám  $n=118-337$ /túlélési nap/oldal). Az optikai denzitás értékek csökkenést szenvedtek el a kontroll értékekhez képest (★: szignifikancia), a postoperatív 1., 3. és 7. napon (Dunn-féle *post hoc* próba  $p<0,001$ ) mind ipsi- és contralateralisan. A 14. napon ismét a kontroll értékekkel megegyező átlagos optikai denzitásértékeket mértünk (Dunn-féle *post hoc* próba,  $p>0,999$  (ipsilateralis) és  $p=0,024$  (contralaterlis)) **(18. ábra, 3. táblázat)**.

## 6. MEGBESZÉLÉS

### 6.1 *Eredményeink rövid összefoglalása*

Laborunkban sikerült rutinszerűen meghonosítani a féloldali labyrinthus laesio műtéti formáját, mely az egyensúlyozó szervi állatmodellek bevett gyakorlata világszerte. A műtét sikerességének kiértékelésére adaptáltuk a Günther et al., (2015) szerinti 10 pontos kritériumrendszert.

A laesio utáni mintegy 7 napban a **tenascin-R** extracellularis jelenléte meredeken lecsökkent. Szemikvantitatív kiértékelés révén szignifikáns mértékű változást a nucleus vestibularis superiorban, a nucleus vestibularis lateralisban és a NVD rostralis részében tapasztaltunk a postoperatív napok immunreaktivitásait összehasonlítva. A módszer korlátai ellenére a postoperatív 1., 3. és 7. napokig tudtunk szignifikáns különbségeket megfigyelni, azt követően azonban nem. Valamint megfigyeltük, hogy a magkomplexum minden részében átmenetinek bizonyult a TN-R jelenlét esése. A TN-R esetében viszont ipsi- és contralateralis neuronok között nem találtunk szignifikáns eltérést, amelyet a módszer alacsony érzékenységének tulajdonítottunk. A **brevican** extracellularis jelenléte hasonló dinamikát mutatott a tenascin-R-éhez, azonban jóval elhúzódóbb, a 7. postoperatív napig tartó erős esést láttunk az immunogenitásában. A megfigyelési periódus végére (14. nap) a brevican perineuronális immunfestődése visszatért a kontroll értékre, hasonlóan a tenascin-R-hez. A jóval érzékenyebb optikai denzitometria mind ipsi- és contralateralisan is szignifikáns brevican csökkenést igazolt a nucleus vestibularis superior nagyméretű neuronjait fedő perineuronális hálókból. A brevican átmeneti degradációja nem jelentett totális eliminációt a sejtközötti terekből, csupán felfokozott turnover-t. Ennek jeleit az erős/közepes/gyenge immunfestődésű PNN-k arányának balra tolódásában értük tetten, amely szintén átmeneti jelenségnek bizonyult a 14. postoperatív nappal bezárólag. További érdekesség, hogy neuronvesztést nem tapasztaltunk az ipsilateralis NVS-ban.

A radikális érzékszervi laesio ellenére a kísérleti állatok életvitele nagyjából egy hét leforgása alatt rendeződött az idegrendszer plasztikussága folytán. A labyrinthectomia tünetei közül a statikus tünetek 7 nap után tulajdonképpen megszűntek, a dinamikus tünetek ugyan jelentős mértékben rendeződtek, mégis 14 nap után is felismerhetők voltak, illetve később sem szűntek meg. Ez a megfigyelés összevág a szakirodalmi leírásokkal.

Valószínűsítettük a kísérletsorozatunk kezdetekor, hogy a vestibularis magkomplexum neuron típusai különbözőképp vesznek részt a kompenzációs folyamatban. Ezt a PNN-k változásain keresztül tudtuk jelen munkánkban követni, visszautalva az ép patkányon tett

megfigyeléseinkre (Racz et al., 2014). A postoperatív szakaszban a közepes és nagyméretű neuronok perineuronális hálói mutattak változásokat, a kisméretű neuronok környezetében nem tapasztaltuk. A változásokban érintett neuronok felelősek a vestibulo-cerebellaris, vestibulo-ocularis, vestibulo-spinalis, thalamicus és autonóm kapcsolatokért, s a laesio tünetei is e kapcsolatokon keresztül értelmezhetők.

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

A korábbi kísérleti felismerések szerint a tenascin-R eltérő szereppel bír a központi idegrendszer egyes területein (Dutia MB, 2010; Lacour M and Tighilet B, 2010). Kísérleti anyagunk alapján a vestibularis kompenzációs folyamatok fontos szereplője, melynek molekuláris indoklását az alábbiakban pontokba vettük:

1. A tenascin-R-ről ismert, hogy aktiválja a mikroglia sejteket, amelyek válaszul cytokineket és növekedési faktorokat választanak ki, beleértve a BDGF-t (brain-derived growth factor) és a NGF-t (neurotrophic growth factor) (Liao H et al., 2005). Patkányokban az egyoldali labyrinthus laesio során deafferentált vestibularis magokban intenzív mikroglia reakció mutatkozott már a beavatkozást követő első napon és ez az intenzív reakció több héttel a kísérleti műtétek után is jelen volt (Campos Torres A et al., 1999). Ezen mikroglia aktiváció az egyik felelőse a műtét után 1-3 nappal kialakuló astroglia reakciónak (de Waele C et al., 1996). Ahogy Campos Torres A et al., (2005) leírja, az aktivált astrocyták által termelt növekedési faktorok, valamint pro- és anti-inflammatorikus citokinek elősegítik a deafferentált vestibularis neuronok túlélését és hozzájárulnak membrán potenciáljuk helyreállításához (Dieringer N, 1995; Dutheil S et al., 2013; Li H et al., 1999; Straka H et al., 2005; Vibert N et al., 1995). Ezeket az eredményeket támogatva Lacour and Tighilet, (2010) megerősítették azt, hogy az egyoldali labyrinthectomia után a tenascin-R receptoron keresztül meginduló BDNF upreguláció bilaterálisan már az első posztoperatív napon megjelent és a festődési intenzitás csúcsát a 3. napon érte el a NVD és a NVL neuronjaiban. Átlagosan a 3. postoperatív naptól, egyes magokban viszont a 7. naptól (**13. és 14. ábrák**) a neuropilben tapasztalt fokozódó intenzitású tenascin-R jelölés összefüggésbe hozható a korai mikroglia aktivációval. Elmondható, hogy a tenascin-R expresszió növekedése elősegítheti a vestibularis magok plaszticitását, és hozzájárul a vestibularis laesio tüneteinek korai rendeződéséhez.

2. Az extracellularis matrix fiziológias körülmények között a synapsisok stabilizálása révén gátolja jelentős mennyiségű új synapticus kapcsolat kialakulását, ill. synapticus plaszticitását (Galtrey CM and Fawcett JW, 2007). Tanulmányunkban az operált oldalon, magtól függetlenül észleltük a tenascin-R immunreaktivitás csökkenését, helyenként igen radikálisan, a műtét utáni első napon. A csökkenő festődési intenzitás, vagyis a non-permisszív tenascin-R csökkenő jelenléte feltételezhetően serkenti a synapticus plaszticitást, illetve egyes feltételezések szerint synaptogenezist, amely jelen kísérleti megközelítésben nem bizonyítható (de Waele C et al., 2000; Dieringer N, 1995; Lacour M and Tighilet B, 2010; Li H, Godfrey DA and Rubin AM, 1999).

Kísérleti vizsgálatok kimutatták, hogy tenascin-R KO egerekben végzett gerincvelői harántlaesio után a neuronális regeneráció jelentősebb volt, a laesio tünetei előbb mérséklődtek, mint a vad típusú kontroll állatokon (Apostolova I et al., 2006). Ezt adaptálva úgy véltük, hogy a kísérletsorozatunkban látott átmeneti tenascin-R expresszió csökkenésnek szerepe van a vestibularis kompenzációs folyamatok elindításában, a vestibularis tünetek mérséklődésében.

3. A tenascin-R vestibularis kompenzációban betöltött lehetséges szerepe a kétoldali vestibularis magok közötti commissuralis útvonalak lehetséges gátlása (Bergquist F et al., 2008; Holstein GR et al., 1999; Malinvaud D et al., 2010). Az egyoldali labyrinthus kiirtás komoly egyensúly zavart okozott a GABA-erg commissurális rendszerben, ez felelős a statikus szemmozgási és a testtartási tünetekért. Hasonlóképpen, az ép és a deafferentált vestibularis magok esetében tapasztalt eltérő spontán nyugalmi aktivitás mögött is az operált és nem operált oldal közötti GABA-erg kölcsönhatás kiegyenlítetlenné válása állhat (Gliddon CM et al., 2004). A commissuralis gátlás egyensúlyának helyreállításával a kétoldali nyugalmi aktivitási értékek is normalizálódnak (Bergquist F et al., 2008; Gliddon CM et al., 2004; Straka H et al., 2005; Tighilet B et al., 2007). A tenascin-R a HNK-1 (human natural killer cell) glycoproteinhez kapcsolódva képes szabályozni a GABA<sub>B</sub> receptor által közvetített perisomaticus gátlást és ezáltal befolyásolja a synapticus átvitelt és a plaszticitást a hippocampusban (Brenneke F et al., 2004; Brenneke F et al., 2004; Bukalo O et al., 2001; Dityatev A and Schachner M, 2003; Saghatelyan AK et al., 2000). Mivel egyoldali labyrinthectomia után a laesioval megegyező oldali NVM neuronjain észlelt GABA<sub>B</sub> receptorok down-regulációja bizonyított (Horii A et al.,

2003; Yamanaka T et al., 2000), a tenascin-R szabályozó funkciója is hasonló lehet a vestibularis rendszerben.

4. A tenascin-R halmozódást több munkacsoport is felismerte a nagy myelinizált axonok Ranvier-féle befűződéseiben (Apostolova I et al., M, 2006; Bekku Y et al., 2009). A tenascin-R a feszültség függő  $\text{Na}^+$  csatornák béta alegységének modulátora, ill. azokat deszenzitizálja az axon membránban (Srinivasan J et al., 1998; Xiao ZC et al., 1999). A tenascin-R génkiütött egerekben myelinizált axonok ingerületvezetési sebessége jelentősen csökkent (Weber P et al., 1999). Mivel a vestibularis magok neuronjai nagy kaliberű myelinizált axonokkal rendelkeznek (Sotelo C and Palay SL, 1970), a tenascin-R hasonló funkciója itt is feltételezhető.

### **6.3 A brevican vélhető szerepe vestibularis kompenzációban**

A brevican pozitív PNN-val rendelkező neuronok százalékos arányában a kontrollhoz képest kismértékű kétoldali csökkenését tapasztaltunk a vizsgált posztoperatív időszakban. Habár a csökkenés nem volt statisztikailag szignifikáns a laesios és ellenoldali magvakban sem, mégis érdemesnek találjuk megemlíteni későbbi sejthalál vizsgálatokra való tekintettel, hogy a csökkenés számított értéke nagyobb volt a műtéti oldalon. Egy korábbi, egereken végzett kísérlet részben eltérő eredményeket mutatott a PNN-k százalékos arányában a NVL- ban UL-t követően (Faralli A et al., 2016). Faralli a CSPG-k általános markerét (WFA) alkalmazták a PNN abszolút számszerűsítéséhez, így látszólag ellentmond az általunk leírtaknak. Munkacsoportunk, ill. Faralli eredményei közötti különbségek a következő okokkal magyarázhatók:

1. Filogenetikailag konzervatív felépítésük ellenére megfigyelhetők faji különbségek egér és patkány vestibularis magkomplexuma között (de Waele C et al., 1996; Lacour M and Tighilet B, 2010; Tighilet B and Lacour M, 2001).
2. Egéren végzett kísérleteikben a PNN-eket *Wisteria floribunda* agglutininnel jelölték (Faralli A et al., 2016) amely, mint általános marker, minden proteoglycan *N*-acetylgalaktózamin szubsztituenséhez kötődik (Hartig W et al., 1992), így nem nyílt lehetőségük különbséget tenni az egyes lectican molekulák jelenléte között.
3. Az NVL és NVS különböző funkciókat látnak el, amely afferens és efferens kapcsolataikban is megjelenik. A NVS részt vesz a vestibulo-ocularis reflex

szabályozásában, míg az NVL a testtartásért és az egyensúlyszabályozásért felelős a gerincvelői és kisagyi kapcsolatai révén (Brodal A, 1984; Donevan AH et al., 1992; Hirai N and Uchino Y, 1984; McCall AA and Yates BJ, 2011; McCrea RA et al., 1987).

Az NVS-ban a brevican pozitív PNN-val borított neuronok gyakorlatilag változatlan százalékos arányával ellentétben a brevican reakció PNN-ban mért optikai denzitása mindkét oldalon szignifikánsan kisebb volt a kontrollhoz képest az 1., 3. és 7. posztoperatív napon. Az első posztoperatív napon bekövetkezett átmeneti csökkenés után a 3. napon az optikai denzitás emelkedése volt megfigyelhető, bár ez az emelkedés csak a deafferenciáció oldalán volt statisztikailag szignifikáns. Ezt követően további emelkedést vártunk és tapasztaltunk a következő posztoperatív napokon, mivel a vestibularis tünetek folyamatos javulást mutattak (Dieringer N, 1995; Hitier M et al., 2010; Lacour M et al., 2016; Vidal PP et al., 1998), párhuzamosan a PNN-ban tapasztalt CSPG és a tenascin-R festődési intenzitás helyreállításával (Deak A et al., 2012; Faralli A et al., 2016). Ezzel a várakozással ellentétben az NVS perineuronális hálóiban mért optikai denzitás értékek markánsabb és statisztikailag szignifikáns csökkenést mutattak mindkét oldalon a 7. napon, a kontroll szint közel felére csökkenve. Ez a megállapítás összefüggésbe hozható a statikus és dinamikus tünetek kompenzációjának eltérő időbeli lefutásával. A statikus tünetek a posztoperatív 7. napon szinte teljesen helyreállnak, míg a dinamikus hónapokkal később is felismerhetők. Számos tanulmány kimutatta, hogy az ECM részeként jelenlévő CSPG-k korlátozzák a központi idegrendszer plaszticitását (Pizzorusso T et al., 2000; Sorg BA et al., 2016; Wang D and Fawcett J, 2012). Így valószínűsíthetően a lecsökkent brevican expresszió felgyorsíthatja a nem vestibularis eredetű afferensek és a NVS neuronjai között meglévő synapsisok adaptációját (de Waele C et al., 2000; Dieringer N, 1995; Gacek RR et al., 1988).

A 14. posztoperatív napon az operált állatokban mért optikai denzitás mind az ipsi-, mind az ellenoldalon visszaállt a kontroll értékekre. Ez arra utal, hogy a brevican részt vesz az átrendeződött synapticus állapot stabilizálásában (Blosa M et al., 2013; Favuzzi E et al., 2017; Frischknecht R et al., 2009).

A brevican a káliumcsatornák, illetve az AMPA receptorok helyben tartása révén is szabályozza a synapsisok plasztikus adaptálódását a hippocampusban (Favuzzi E et al., 2017). A brevican gyors synapticus ingerület átvitelben betöltött szerepe is igazolódott a halló rendszer területén (Blosa M et al., 2013; Sonntag M et al., 2018). A halló- és vestibularis pályarendszer közös embryonális eredete, valamint hasonló morfológiai, fiziológiai és neurokémiai

tulajdonságaik alapján feltételezzük, hogy a 14. postoperatív napon az NVS-ben megemelkedett brevican expresszió, a gyors synapticus transzmisszió helyreállításával is összefügg.

A mért fluoreszcencia intenzitásuk alapján a PNN-kat erős, közepes és gyenge festődésű kategóriákba soroltuk. A kontroll csoporthoz viszonyítva legintenzívebb festődési csökkenést az első postoperatív héten figyeltük meg mindkét oldali vestibularis magkomplexumban. A közepes festődésű kategóriában ezzel a csökkenéssel párhuzamosan a PNN-ek százalékos aránya az 1. és a 3. napon emelkedett, és a posztoperatív 7. napon mindkét oldalon visszaállt a kontroll szintre. A gyengén festett csoportban a PNN-ek százalékos változása kisebb eltéréseket mutatott az 1. és 3. napon az ipsi- és kontralaterális oldalon. A 14. posztoperatív napon a gyenge kategória értéke mindkét oldalon visszaállt a kontroll szintre, míg az erősen festődő PNN-ek százalékos aránya kisebb volt, mint a nem operált oldalon. Mivel a NVS morfológiailag és funkcionálisan eltérő neuronokat tartalmaz (Mitsacos A et al., 1983), feltételezzük, hogy a brevican festődési intenzitása sem egységes a NVS perineuronális hálóiban, mely tetten érhető a kontroll- és operált csoportokban is (Racz E et al., 2014). A postoperatív szakban észlelt festődési intenzitásban bekövetkező eltérő változások az egyes neuronok vestibularis kompenzációban betöltött eltérő szerepére utal. Az NVS motoneuronjai patkányban a vestibulo-ocularis reflexben (VOR) vesznek részt. Egerekben az egyoldali labyrinthectomia sokkal nagyobb emelkedést indukált a gyenge festődést mutató kategóriában a NVL neuronjai körül a műtött oldalon, és az értékek a 14. posztoperatív napon visszaálltak a kontroll szintre (Faralli A et al., 2016). A különbségek lehetséges magyarázatait fentebb ismertettük.

#### ***6.4 A PNN átmenetileg változik kompenzáció során***

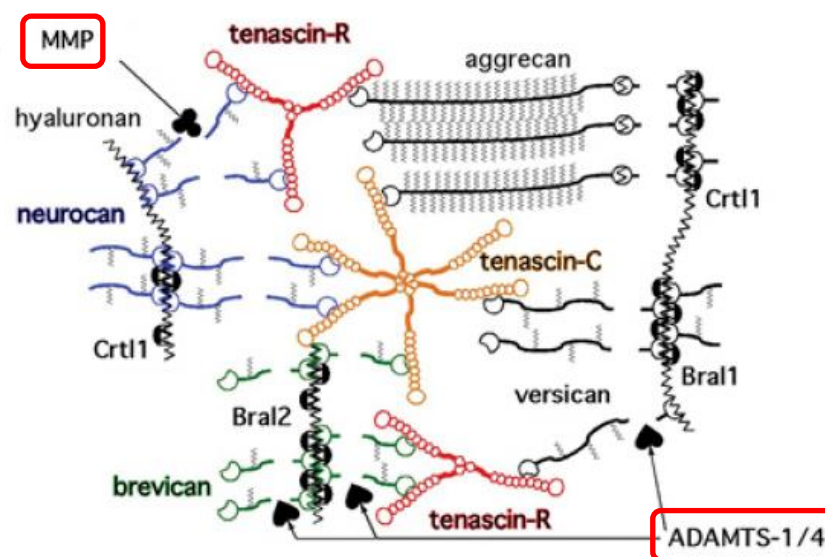
Egyoldali labyrinthus kiirtás az ipsilateralis szenzoros impulzusok megszűnését eredményezi, amely kihat mindkét oldali vestibularis neuronok működésére. A laesios tünetek eltérő időpontokban jelentkező javulása arra enged következtetni, hogy az egyes vestibularis magok eltérő hozzájárulással vesznek részt a kompenzációban.

Synapsisok plasztikus változásaiban az ECM szerepe mintegy két évtizede ismert, immár nem csak fiziológiás eseményekben, mint a tanulás és felejtés, hanem az általunk is vizsgált laesiot követő kompenzációban is. Az ECM, ill. szigorúan a PNN-k strukturája merőben összefügg az általa körülvevett neuronok aktivitásával. Az ECM turnover, mint degradábilis extracellularis rögzítőkészülék, a neuronális hálózatok adaptációjának strukturális és funkcionális promotere (Dityatev A et al., 2010). A szulfatált GAG-ok turnover mintegy 24

óra az agyban, az alább sorolt események eredményeképp (Rauch U, 2007). Megfigyelések szerint a HA feleződési ideje hasonlóan a GAG-okhoz, mintegy 12-48 óra (Deak A et al., 2012; Fraser JR et al., 1997).

Az ECM megfigyelhető mértékű módosulásai hátterében eddig több folyamat igazolódott:

- A PNN makromolekuláinak csökkent szintézise, ill. ezzel összefüggésben a hyaluronsav szintázok, link protein 1 és aggrecan (Horii-Hayashi N et al., 2011; Tsilibary E et al., 2014), valamint laborunk megfigyelései szerint, a brevican és tenascin-R csökkent jelenléte a perineuronális terekben;
- Szimultán jelennek meg a matrix bontó enzimek a neuropilben, melyek elsősorban neuronokból szabadulnak fel, ill. *in-situ* hybridizációs leírások alapján, kisebb mértékben ugyan, valószínűsíthetően gliasejtekből is (Vafadari B et al., 2016) (19. ábra).



**19. ábra.** A perisynapticus ECM környezet (PNN) enzimatis lebonása permissív környezetet biztosít synapsisok funkcionális adaptációjához, amely konzekvensen morfológiai átalakulását feltételez. A MMP és ADAMT enzimek (piros keret) a CSPG-k tengelyfehérjéit hasítják. A postsynapticus membránok morfológiai és funkcionális adaptációját ezzel lehetővé teszik. **Forrás:** módosítva Rauch, (2007).

Laborunk és más munkacsoportok kísérletes megfigyelései alapján arra következtethetünk, hogy az érzékszervi állapot megváltozása adaptációs mechanizmust iniciál, mely folyamat neurobiológiai hátterében a synapticus morfológia megváltozása áll. Konzekvensen, számos szimultán elkezdődő és egymástól függő eseménnyel együtt, kompenzációs folyamatok során a perisynapticus molekuláris hálózat non-permissív hatása átmenetileg vagy tartósan mérséklődik (Horii-Hayashi N et al., 2011).

Synapsisok plasztikus adaptációját legrészletesebben a hippocampalis glutamáterg synapsisaiban írták le (Brown JE et al., 2005); valamint ennek legalapvetőbb eseményeit a tanulásban és felejtésben régóta felismert ún. LTP (long-term potentiation) és LTD (long-term depression) jelenségeit. Ugyanezen adaptációs változások a vestibularis magcsoportban is ismeretesek. Donald Hebb elmélete szerint, az input jelintenzitás tartós megváltozása konzekvensen kiváltja a pre- és postsynapticus membránok morfológiai- és fiziológiai változásait, ennek eredményeként a synapticus jel áttevődés hatékonyságának emelkedését vagy lecsökkenését. Mivel a vestibularis primer afferensek boutonjai szintén glutamátergek, feltételezhetjük, hogy egyező plasztikus folyamatok révén kompenzálódik az egyensúlyozó funkció egyoldali érzékszerv elvesztését követően (Balaban CD, 2016; Vidal PP et al., 1998) (20. ábra).

### 6.5 Synapticus plaszticitás subcellularis eseményei

A hippocampus *gyrus dentatus* és CA1 régióiban írták le a közelmúltban, hogy a synapticus plaszticitás környezetgazdagítással fokozódott (Ohline and Abraham, 2019), melynek háttérében a fokozott érzékszervi ingerlés révén kiváltott gyakoribb LTP körvonalazódott. Ezt a leletet megerősíti a patkányokon indukált LTP, melyek a hippocampalis synapsisok pre- és postsynapticus membránjainak morfofunkcionális átalakulását eredményezte. A synapticus áttevődés és proteinfelhalmozás fokozódását elektrofiziológiai és mRNS vizsgálatokkal igazolták (Cao G and Harris KM, 2014). Hasonlóképp, a kisagyi magvakban a PNN denzitás csökkenését és matrixbontó enzim aktivitás erősödését figyelték meg környezetgazdagítási modellben (Foscarin S et al., 2011).

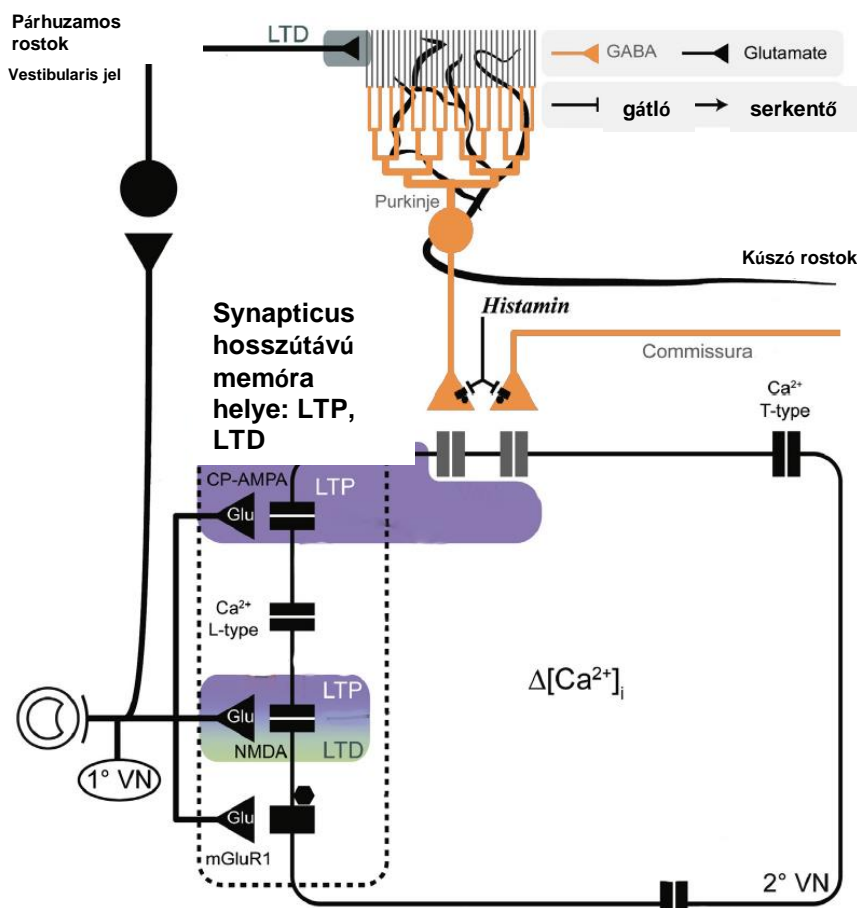
Jelen kísérleti modellünkben a primer afferensek és másodrendű vestibularis neuronok glutamáterg synapsisainak plasztikus adaptációja valószínűsíthető, melyek körül, laborunk korábbi leírása alapján (Racz E et al., 2014) feltételezzük a PNN részvételét:

- a primer afferensek tartós aktivitás fokozódása LTP-t vált ki. A postsynapticus membrán ionotróp NMDA (N-methyl-D-aspartát) és AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) receptorainak ionáteresztő képessége emelkedik, illetve az igen dinamikus forgalmú AMPA receptorok számának növekedése, azok  $\text{Na}^+$  áteresztőképessége növekedésével, és ezzel összefüggésben a postsynapticus membrán felszínnövekedésével jár együtt. Intracellularis expressziós változások szimultán zajlanak a receptorforgalom növekedésével, (L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák és belső raktárakból felszabaduló  $\text{Ca}^{2+}$  emelik a cytoplasmaticus  $\text{Ca}^{2+}$  szintet).

LTD során épp ellenkezőleg:

- a primer afferensek tartósan csökkenő tüzelési gyakorisága a postsynapticus membránban LTD-t vált ki. Eredményeként az AMPA receptorok száma jelentősen lecsökken a postsynapticus membrán aktív zónájában, valamint az NMDA receptorok átjárhatósága is csökkent. A folyamat konklúziója a lecsökkent ingerületátviteli hatékonyság.

Az extrasynapticus **metabotróp glutamát receptorok** (mGluR1) szerepe a plaszticitásban szintén bizonyított. A mGluR1 a cytoplasmaticus  $Ca^{2+}$  szint szabályozás által aktivált génexpressziós útvonalon promotálja az LTP-t. Az LTP-t elindító inger az igen felfokozott neurotranszmitter ürülés a presynapticus membránból, mely a synapticus rés határain túllépve aktiválja az extrasynapticus helyzetű metabotróp receptorokat. (20. ábra)



20. ábra A vestibularis magkomplexumban végződő afferensek sémás ábrázolása, ill. szerepük a plasztikus adaptációk háttérében felismert LTP és LTD-ben. Synapsisok morfofunkcionális adaptációja háttérében feltételezzük az ECM átépülését (folyamatát a 6.3 fejezetben részleteztük). **Forrás:** módosítva Vidal et al., (2015)

Tighilet et al., (2007) macskán elvégzett egyoldali vestibularis neurectomia következményeként írtak le *de novo* neurogenesist a vestibularis magkomplexumban.

Megegyező kísérletet végeztek el felnőtt patkányokon (Rastoldo G et al., 2021). Közleményük szerint UL után nagyjából 3 nappal a NVM-ban intenzív sejtosztódás zajlott, melyek között GABA-erg neuronok, oligodendrocyták, astrocyták voltak, illetve fokozott mikroglia jelenlét is. E sejtek eredetét tekintve feltételezik neurogen multipotens sejtek jelenlétét, amelyek mitotikus aktivitását azonosították BrdU és SOX2 pozitív reakciókkal.

## ***6.6 Synapticus plaszticitás extracellularis eseményei***

A gerincvelő harántzúzása gliális hegszövet felépülését váltja ki, mely a pályakötegek növekedése előtt átléphetetlen barriert képez. Kísérletes körülmények között injektált chondritinse ABC az axonok átnövekedését tette lehetővé patkányban, amely a hátsó végtagi motoros és sensoros funkció javulásában is megjelent (Barritt AW et al., 2006; Bosch KD et al., 2012; Garcia-Alias G and Edgerton VR, 2015). E megfigyelés neuronális *in vitro* kultúrában, valamint intrathecalis injektálás mellett is evidenciát nyert (Wei H et al., 2021). Hasonlóan, HAPLN-1 génkiűtött egerek perirhinalis kérgébe injektált chondroitinse ABC szintén promotálta lokálisan a synapsisok plasztikus változásait, amely az explicit tanulásban és a memória javulásában mutatkozott meg egérben (Romberg C et al., 2013). A látópályában (Tropea D et al., 2003) szintén axonok újraindukált/facilitált növekedését látták a *colliculus superior*-ban, denerváció után alkalmazott chondritinse alkalmazását követően.

Kísérletes körülmények között kiváltott epileptikus rohamok az endogén matrixbontó metalloproteázok (ADAMTS1 és ADAMTS4; a disintegrin and metalloproteases with thrombospondin motifs) EC felszabadulását váltotta ki patkányok *gyrus dentatus*-ában. E kísérleti példában a brevican enzimatisz degradációját is megfigyelték, s ezzel párhuzamosan a synapticus denzitás lecsökkenését írták le (Yuan W et al., 2002) (**19. ábra**).

Az ECM synapticus plaszticitást befolyásoló hatása mögött az alábbi mechanizmusok feltételezhetők, subcellularis kompartmentek szerint idézve (Iozzo RV and Schaefer L, 2015; Oohashi T et al., 2015):

- A CSPG-k, és különösen azok GAG-oldalláncai specifikus receptorokhoz kötődhetnek, melyek intracellularis útvonalak közvetítésével axonok növekedésére vannak hatással. *In vitro* környezetben a contactin-1 sejt felszíni receptor és chondritin-sulfat-E kapcsolata a neurit növekedését stimulálja (Mikami T et al., 2009). Az RPTP $\sigma$  (*receptor protein tyrosine phosphatase sigma*) nagy affinitással kötődik neurocanhoz és aggrecanhoz, így erősen gátolja az axonok növekedését (Sapieha PS et al., 2005; Shen X et al., 2009).

- CSPG-k ismert inhibitoros hatása axonok növekedésre (Tan CL et al., 2011) leírása szerint integrin receptorok inaktivációja révén alakul ki. A laminin-mediált axon növekedést megállítja a pFAK (foszforilált focal adhesion kinase) és pSrc (foszforilált non-receptor tyrosine kinase „sarcoma”) csökkent foszforilációja által, melyek az integrin signalizációhoz köthető útvonalak. Tan leírása szerint a Nogo-A inhibitoros hatása csökkenthető integrin receptor aktiválással a fentebb említett útvonalakon.
- A semaphorin-3A, axon növekedésre kemorepulzív hatású EC effektor, az CSPG-k szulfatált O-4 és O-6 *N*-acetylgalactosamin-jához kötődik s felhalmozódik neuronok WFA-pozitív PNN-iban. A semaphorin-3A pozitív területek egybeestek TN-R, HA, aggrecan és Crtl1 immunreakciókkal. Megfigyelték, hogy link protein-KO egerekben a dezintegrált PNN az említett semaphorin csökkent szintjével és axon barrier hatásának mérséklődésével is együtt járt. (Gutekunst CA et al., 2010; Vo T et al., 2013).

## 7. IRODALOMJEGYZÉK

- Alpar A, Gartner U, Hartig W, Bruckner G (2006), Distribution of pyramidal cells associated with perineuronal nets in the neocortex of rat. *Brain Res* 1120:13-22.
- Apostolova I, Irintchev A, Schachner M (2006), Tenascin-R restricts posttraumatic remodeling of motoneuron innervation and functional recovery after spinal cord injury in adult mice. *J Neurosci* 26:7849-7859.
- Babalian A, Vibert N, Assie G, Serafin M, Muhlethaler M, Vidal PP (1997), Central vestibular networks in the guinea-pig: functional characterization in the isolated whole brain in vitro. *Neuroscience* 81:405-426.
- Babalian AL, Vidal PP (2000), Floccular modulation of vestibuloocular pathways and cerebellum-related plasticity: An in vitro whole brain study. *J Neurophysiol* 84:2514-2528.
- Bacsikai T, Szekely G, Matesz C (2002), Ascending and descending projections of the lateral vestibular nucleus in the rat. *Acta Biol Hung* 53:7-21.
- Bagnall MW, Stevens RJ, du Lac S (2007), Transgenic mouse lines subdivide medial vestibular nucleus neurons into discrete, neurochemically distinct populations. *J Neurosci* 27:2318-2330.
- Balaban CD (2016), Neurotransmitters in the vestibular system. *Handb Clin Neurol* 137:41-55.
- Balmer TS (2016), Perineuronal Nets Enhance the Excitability of Fast-Spiking Neurons. *eNeuro* 3.
- Balmer TS, Carels VM, Frisch JL, Nick TA (2009), Modulation of perineuronal nets and parvalbumin with developmental song learning. *J Neurosci* 29:12878-12885.
- Bandtlow CE, Zimmermann DR (2000), Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev* 80:1267-1290.
- Barritt AW, Davies M, Marchand F, Hartley R, Grist J, Yip P, McMahon SB, Bradbury EJ (2006), Chondroitinase ABC promotes sprouting of intact and injured spinal systems after spinal cord injury. *J Neurosci* 26:10856-10867.
- Bekku Y, Rauch U, Ninomiya Y, Oohashi T (2009), Brevican distinctively assembles extracellular components at the large diameter nodes of Ranvier in the CNS. *J Neurochem* 108:1266-1276.
- Bekku Y, Su WD, Hirakawa S, Fassler R, Ohtsuka A, Kang JS, Sanders J, Murakami T, et al. (2003), Molecular cloning of Bral2, a novel brain-specific link protein, and immunohistochemical colocalization with brevican in perineuronal nets. *Mol Cell Neurosci* 24:148-159.
- Bergquist F, Ludwig M, Dutia MB (2008), Role of the commissural inhibitory system in vestibular compensation in the rat. *J Physiol* 586:4441-4452.
- Blosa M, Sonntag M, Bruckner G, Jager C, Seeger G, Matthews RT, Rubsamen R, Arendt T, et al. (2013), Unique features of extracellular matrix in the mouse medial nucleus of trapezoid body--implications for physiological functions. *Neuroscience* 228:215-234.
- Bosch KD, Bradbury EJ, Verhaagen J, Fawcett JW, McMahon SB (2012), Chondroitinase ABC promotes plasticity of spinal reflexes following peripheral nerve injury. *Exp Neurol* 238:64-78.
- Braunewell KH, Martini R, LeBaron R, Kresse H, Faissner A, Schmitz B, Schachner M (1995), Up-regulation of a chondroitin sulphate epitope during regeneration of mouse sciatic nerve: evidence that the immunoreactive molecules are related to the chondroitin sulphate proteoglycans decorin and versican. *Eur J Neurosci* 7:792-804.
- Brenneke F, Bukalo O, Dityatev A, Lie AA (2004), Mice deficient for the extracellular matrix glycoprotein tenascin-r show physiological and structural hallmarks of increased hippocampal excitability, but no increased susceptibility to seizures in the pilocarpine model of epilepsy. *Neuroscience* 124:841-855.
- Brenneke F, Schachner M, Elger CE, Lie AA (2004), Up-regulation of the extracellular matrix glycoprotein tenascin-R during axonal reorganization and astrogliosis in the adult rat hippocampus. *Epilepsy Res* 58:133-143.
- Brodal A (1984), The vestibular nuclei in the macaque monkey. *J Comp Neurol* 227:252-266.
- Brown JE, Card JP, Yates BJ (2005), Polysynaptic pathways from the vestibular nuclei to the lateral mammillary nucleus of the rat: substrates for vestibular input to head direction cells. *Exp Brain Res* 161:47-61.

- Brown SM, Henning S, Wellman CL (2005), Mild, short-term stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 15:1714-1722.
- Bruckner G, Morawski M, Arendt T (2008), Aggrecan-based extracellular matrix is an integral part of the human basal ganglia circuit. *Neuroscience* 151:489-504.
- Bukalo O, Schachner M, Dityatev A (2001), Modification of extracellular matrix by enzymatic removal of chondroitin sulfate and by lack of tenascin-R differentially affects several forms of synaptic plasticity in the hippocampus. *Neuroscience* 104:359-369.
- Camp AJ, Callister RJ, Brichta AM (2006), Inhibitory synaptic transmission differs in mouse type A and B medial vestibular nucleus neurons in vitro. *J Neurophysiol* 95:3208-3218.
- Campos Torres A, Vidal PP, de Waele C (1999), Evidence for a microglial reaction within the vestibular and cochlear nuclei following inner ear lesion in the rat. *Neuroscience* 92:1475-1490.
- Cao G, Harris KM (2014), Augmenting saturated LTP by broadly spaced episodes of theta-burst stimulation in hippocampal area CA1 of adult rats and mice. *J Neurophysiol* 112:1916-1924.
- Carulli D, Broersen R, de Winter F, Muir EM, Meskovic M, de Waal M, de Vries S, Boele HJ, et al. (2020), Cerebellar plasticity and associative memories are controlled by perineuronal nets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117:6855-6865.
- Carulli D, Rhodes KE, Brown DJ, Bonnert TP, Pollack SJ, Oliver K, Strata P, Fawcett JW (2006), Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components. *J Comp Neurol* 494:559-577.
- Celio MR, Spreafico R, De Biasi S, Vitellaro-Zuccarello L (1998), Perineuronal nets: past and present. *Trends Neurosci* 21:510-515.
- Chaturvedi M, Kaczmarek L (2014), Mmp-9 inhibition: a therapeutic strategy in ischemic stroke. *Mol Neurobiol* 49:563-573.
- Chiquet-Ehrismann R, Tucker RP (2011), Tenascins and the importance of adhesion modulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
- Counter SA, Damberg P, Aski SN, Nagy K, Engmér C, Laurell B & G (2015). Experimental Fusion of Contrast Enhanced High-Field Magnetic Resonance Imaging and High-Resolution Micro-Computed Tomography in Imaging the Mouse Inner Ear. *The Open Neuroimaging Journal*, 9, 7-12.
- de Waele C, Campos Torres A, Josset P, Vidal PP (1996), Evidence for reactive astrocytes in rat vestibular and cochlear nuclei following unilateral inner ear lesion. *Eur J Neurosci* 8:2006-2018.
- de Waele C, Loquet G, Campos Torres A, Vidal PP (2000), Lack of growth-associated protein-43 reemergence or of growth-associated protein-43 mRNA modulation in deafferented vestibular nuclei during the first 6 weeks after unilateral inner ear lesion. *Exp Brain Res* 132:464-475.
- Deak A, Bacskai T, Gaal B, Racz E, Matesz K Effect of unilateral labyrinthectomy on the molecular composition of perineuronal nets in the lateral vestibular nucleus of the rat. *Neurosci Lett* 513:1-5.
- DeAngelis PL (1999), Hyaluronan synthases: fascinating glycosyltransferases from vertebrates, bacterial pathogens, and algal viruses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 56:670-682.
- Devesahayan PR, Narayana P (2012), *Vertigo: Clinical Practice and Examination*. JP Br. Medical Publishers Ltd.
- Diaz C, Glover JC, Puelles L, Bjaalie JG (2003), The relationship between hodological and cytoarchitectonic organization in the vestibular complex of the 11-day chicken embryo. *J Comp Neurol* 457:87-105.
- Dieringer N (1995), 'Vestibular compensation': neural plasticity and its relations to functional recovery after labyrinthine lesions in frogs and other vertebrates. *Prog Neurobiol* 46:97-129.
- Dimatelis JJ, Stein DJ, Russell VA (2013), Chronic exposure to light reverses the effect of maternal separation on proteins in the prefrontal cortex. *J Mol Neurosci* 51:835-843.
- Dityatev A, Rusakov DA (2011), Molecular signals of plasticity at the tetrapartite synapse. *Curr Opin Neurobiol* 21:353-359.
- Dityatev A, Schachner M (2003), Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 4:456-468.

- Dityatev A, Schachner M, Sonderegger P (2010), The dual role of the extracellular matrix in synaptic plasticity and homeostasis. *Nat Rev Neurosci* 11:735-746.
- Donevan AH, MacDonald JA, Brennan PA, Rose PK (1992), Morphology of single vestibulospinal collaterals in the upper cervical spinal cord of the cat. II. Collaterals originating from axons outside the ventral funiculi. *J Comp Neurol* 322:343-359.
- du Lac S, Lisberger SG (1995), Membrane and firing properties of avian medial vestibular nucleus neurons in vitro. *J Comp Physiol A* 176:641-651.
- Dutheil S, Escoffier G, Gharbi A, Watabe I, Tighilet B (2013), GABA(A) receptor agonist and antagonist alter vestibular compensation and different steps of reactive neurogenesis in deafferented vestibular nuclei of adult cats. *J Neurosci* 33:15555-15566.
- Dutia MB (2010), Mechanisms of vestibular compensation: recent advances. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 18:420-424.
- Ewald J (1882), *Physiologische Untersuchungen über das Endorgan des Nervus Octavus*. Wiesbaden, Bergman
- Faralli A, Dagna F, Albera A, Bekku Y, Oohashi T, Albera R, Rossi F, Carulli D (2016), Modifications of perineuronal nets and remodelling of excitatory and inhibitory afferents during vestibular compensation in the adult mouse. *Brain Struct Funct* 221:3193-3209.
- Favuzzi E, Marques-Smith A, Deogracias R, Winterflood CM, Sanchez-Aguilera A, Mantoan L, Maeso P, Fernandes C, et al. (2017), Activity-Dependent Gating of Parvalbumin Interneuron Function by the Perineuronal Net Protein Brevican. *Neuron* 95:639-655 e610.
- Flourens MJP. *Recherches expérimentales sur les propriétés et les fonctions du système nerveux dans les animaux vertébrés*. Paris: JB Ballière, 1842.
- Foscarin S, Ponchione D, Pajaj E, Leto K, Gawlak M, Wilczynski GM, Rossi F, Carulli D (2011), Experience-dependent plasticity and modulation of growth regulatory molecules at central synapses. *PLoS One* 6:e16666.
- Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB (1997), Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med* 242:27-33.
- Frischknecht R, Heine M, Perrais D, Seidenbecher CI, Choquet D, Gundelfinger ED (2009), Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nat Neurosci* 12:897-904.
- Frischknecht R, Seidenbecher CI (2012), Brevican: a key proteoglycan in the perisynaptic extracellular matrix of the brain. *Int J Biochem Cell Biol* 44:1051-1054.
- Gaal B, Johannesson EO, Dattani A, Magyar A, Weber I, Matesz C (2015), Modification of tenascin-R expression following unilateral labyrinthectomy in rats indicates its possible role in neural plasticity of the vestibular neural circuit. *Neural Regen Res* 10:1463-1470.
- Gacek RR, Lyon MJ, Schoonmaker J (1988), Ultrastructural changes in vestibulo-ocular neurons following vestibular neurectomy in the cat. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 97:42-51.
- Galtrey CM, Fawcett JW (2007), The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain Res Rev* 54:1-18.
- Garcia-Alias G, Edgerton VR (2015), Who is who after spinal cord injury and repair? Can the brain stem descending motor pathways take control of skilled hand motor function? *Neural Regen Res* 10:1735-1736.
- Gliddon CM, Darlington CL, Smith PF (2004), Rapid vestibular compensation in guinea pig even with prolonged anesthesia. *Neurosci Lett* 371:138-141.
- Goltz F (1870), *Ueber die physiologische Bedeutung der Bogengänge des Ohrlabyrinths*. *Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*.
- Günther L, Beck L, Xiong G, Potschka H, Jahn K, Bartenstein P, Brandt T, Dutia M, Dieterich M, Strupp M, la Fougère C, Zwergal A (2015), N-Acetyl-L-Leucine Accelerates Vestibular Compensation after Unilateral Labyrinthectomy by Action in the Cerebellum and Thalamus. *Plos One* 10(3)
- Gutekunst CA, Stewart EN, Gross RE (2010), Immunohistochemical Distribution of PlexinA4 in the Adult Rat Central Nervous System. *Front Neuroanat* 4.

- Halasi G, Wolf E, Bacskai T, Szekely G, Modis L, Szigeti ZM, Meszar Z, Felszeghy S, et al. (2007), The effect of vestibular nerve section on the expression of the hyaluronan in the frog, *Rana esculenta*. *Brain Struct Funct* 212:321-334.
- Hartig W, Brauer K, Bruckner G (1992), *Wisteria floribunda* agglutinin-labelled nets surround parvalbumin-containing neurons. *Neuroreport* 3:869-872.
- Hedstrom KL, Xu X, Ogawa Y, Frischknecht R, Seidenbecher CI, Shrager P, Rasband MN (2007), Neurofascin assembles a specialized extracellular matrix at the axon initial segment. *J Cell Biol* 178:875-886.
- Highstein SM (1971), Organization of the inhibitory and excitatory vestibulo-ocular reflex pathways to the third and fourth nuclei in rabbit. *Brain Res* 32:218-224.
- Hirai N, Uchino Y (1984), Superior vestibular nucleus neurones related to the excitatory vestibulo-ocular reflex of anterior canal origin and their ascending course in the cat. *Neurosci Res* 1:73-79.
- Hirakawa S, Oohashi T, Su WD, Yoshioka H, Murakami T, Arata J, Ninomiya Y (2000), The brain link protein-1 (BRAL1): cDNA cloning, genomic structure, and characterization as a novel link protein expressed in adult brain. *Biochem Biophys Res Commun* 276:982-989.
- Hitier M, Besnard S, Vignaux G, Denise P, Moreau S (2010), The ventrolateral surgical approach to labyrinthectomy in rats: anatomical description and clinical consequences. *Surg Radiol Anat* 32:835-842.
- Holstein GR, Friedrich VL, Jr., Kang T, Kukielka E, Martinelli GP (2011), Direct projections from the caudal vestibular nuclei to the ventrolateral medulla in the rat. *Neuroscience* 175:104-117.
- Holstein GR, Martinelli GP, Wearne S, Cohen B (1999), Ultrastructure of vestibular commissural neurons related to velocity storage in the monkey. *Neuroscience* 93:155-170.
- Horii-Hayashi N, Yoshikawa M, Matsusue Y, Ishizaka S, Nishi M, Wanaka A (2011), Environmental stimulation changes tissue-type plasminogen activator activity in the adult mouse hippocampus. *Neurochem Int* 58:1-4.
- Horii A, Kitahara T, Smith PF, Darlington CL, Masumura C, Kubo T (2003), Effects of unilateral labyrinthectomy on GAD, GAT1 and GABA receptor gene expression in the rat vestibular nucleus. *Neuroreport* 14:2359-2363.
- Hudak JE, Bertozzi CR (2014), Glycotherapy: New Advances Inspire a Reemergence of Glycans in Medicine. *Chemistry & Biology* 21:16-37.
- Iozzo RV, Schaefer L (2015), Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol* 42:11-55.
- Ito M, Highstein SM, Tsuchiya T (1970), The postsynaptic inhibition of rabbit oculomotor neurones by secondary vestibular impulses and its blockage by picrotoxin. *Brain Res* 17:520-523.
- Jang B, Kim A, Hwang J, Song HK, Kim Y, Oh ES (2020), Emerging Role of Syndecans in Extracellular Matrix Remodeling in Cancer. *J Histochem Cytochem* 68:863-870.
- Jaworski DM, Kelly GM, Piepmeier JM, Hockfield S (1996), BEHAB (brain enriched hyaluronan binding) is expressed in surgical samples of glioma and in intracranial grafts of invasive glioma cell lines. *Cancer Res* 56:2293-2298.
- John N, Krugel H, Frischknecht R, Smalla KH, Schultz C, Kreutz MR, Gundelfinger ED, Seidenbecher CI (2006), Brevican-containing perineuronal nets of extracellular matrix in dissociated hippocampal primary cultures. *Mol Cell Neurosci* 31:774-784.
- Johnston AR, MacLeod NK, Dutia MB (1994), Ionic conductances contributing to spike repolarization and afterpotentials in rat medial vestibular nucleus neurones. *J Physiol* 481 ( Pt 1):61-77.
- Jones FS, Jones PL (2000), The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn* 218:235-259.
- Jones LL, Sajed D, Tuszyński MH (2003), Axonal regeneration through regions of chondroitin sulfate proteoglycan deposition after spinal cord injury: a balance of permissiveness and inhibition. *J Neurosci* 23:9276-9288.
- Kang S, Jun S, Baek SJ, Park H, Yamamoto Y, Tanaka-Yamamoto K (2021), Recent Advances in the Understanding of Specific Efferent Pathways Emerging From the Cerebellum. *Front Neuroanat* 15:759948.

- Knapska E, Lioudyno V, Kiryk A, Mikosz M, Gorkiewicz T, Michaluk P, Gawlak M, Chaturvedi M, et al. (2013), Reward learning requires activity of matrix metalloproteinase-9 in the central amygdala. *J Neurosci* 33:14591-14600.
- Kolkman KE, McElvain LE, du Lac S (2011), Diverse precerebellar neurons share similar intrinsic excitability. *J Neurosci* 31:16665-16674.
- Kowitsch A, Zhou G, Groth T (2018), Medical application of glycosaminoglycans: a review. *J Tissue Eng Regen Med* 12:e23-e41.
- Kwok JC, Dick G, Wang D, Fawcett JW (2011), Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Dev Neurobiol* 71:1073-1089.
- Lacour M, Helmchen C, Vidal PP (2016), Vestibular compensation: the neuro-otologist's best friend. *J Neurol* 263 Suppl 1:S54-64.
- Lacour M, Tighilet B (2010), Plastic events in the vestibular nuclei during vestibular compensation: the brain orchestration of a "deafferentation" code. *Restor Neurol Neurosci* 28:19-35.
- Ladpli R, Brodal A (1968), Experimental studies of commissural and reticular formation projections from the vestibular nuclei in the cat. *Brain Res* 8:65-96.
- Lander C, Zhang H, Hockfield S (1998), Neurons produce a neuronal cell surface-associated chondroitin sulfate proteoglycan. *J Neurosci* 18:174-183.
- Lau LW, Cua R, Keough MB, Haylock-Jacobs S, Yong VW (2013), Pathophysiology of the brain extracellular matrix: a new target for remyelination. *Nat Rev Neurosci* 14:722-729.
- Li H, Godfrey DA, Rubin AM (1999), Astrocyte reaction in the rat vestibular nuclei after unilateral removal of Scarpa's ganglion. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 108:181-188.
- Liao H, Bu WY, Wang TH, Ahmed S, Xiao ZC (2005), Tenascin-R plays a role in neuroprotection via its distinct domains that coordinate to modulate the microglia function. *J Biol Chem* 280:8316-8323.
- Liu BP, Cafferty WB, Budel SO, Strittmatter SM (2006), Extracellular regulators of axonal growth in the adult central nervous system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1593-1610.
- Magnus R (1924), *Körperstellung*. Berlin: Springer.
- Malinvaud D, Vassias I, Reichenberger I, Rossert C, Straka H (2010), Functional organization of vestibular commissural connections in frog. *J Neurosci* 30:3310-3325.
- Margolis RK, Preti C, Chang L, Margolis RU (1975), Metabolism of the protein moiety of brain glycoproteins. *J Neurochem* 25:707-709.
- Matesz C, Modis L, Halasi G, Szigeti ZM, Felszeghy S, Bacskai T, Szekely G (2005), Extracellular matrix molecules and their possible roles in the regeneration of frog nervous system. *Brain Res Bull* 66:526-531.
- Matesz C, Nagy E, Kulik A, Tonkol A (1997), Projections of the medial and superior vestibular nuclei to the brainstem and spinal cord in the rat. *Neurobiology (Bp)* 5:489-493.
- McCall AA, Yates BJ (2011), Compensation following bilateral vestibular damage. *Front Neurol* 2:88.
- McCrea RA, Strassman A, May E, Highstein SM (1987), Anatomical and physiological characteristics of vestibular neurons mediating the horizontal vestibulo-ocular reflex of the squirrel monkey. *J Comp Neurol* 264:547-570.
- Meszar Z, Felszeghy S, Veress G, Matesz K, Szekely G, Modis L (2008), Hyaluronan accumulates around differentiating neurons in spinal cord of chicken embryos. *Brain Res Bull* 75:414-418.
- Michaluk P, Kaczmarek L (2007), Matrix metalloproteinase-9 in glutamate-dependent adult brain function and dysfunction. *Cell Death Differ* 14:1255-1258.
- Michaluk P, Wawrzyniak M, Alot P, Szczot M, Wyrembek P, Mercik K, Medvedev N, Wilczek E, et al. (2011), Influence of matrix metalloproteinase MMP-9 on dendritic spine morphology. *J Cell Sci* 124:3369-3380.
- Mikami T, Yasunaga D, Kitagawa H (2009), Contactin-1 is a functional receptor for neuroregulatory chondroitin sulfate-E. *J Biol Chem* 284:4494-4499.

- Milev P, Maurel P, Chiba A, Mevissen M, Popp S, Yamaguchi Y, Margolis RK, Margolis RU (1998), Differential regulation of expression of hyaluronan-binding proteoglycans in developing brain: aggrecan, versican, neurocan, and brevican. *Biochem Biophys Res Commun* 247:207-212.
- Mitsacos A, Reisine H, Highstein SM (1983), The Superior Vestibular Nucleus - an Intracellular Hrp Study in the Cat .1. Vestibulo-Ocular Neurons. *Journal of Comparative Neurology* 215:78-91.
- Mitsacos A, Reisine H, Highstein SM (1983), The superior vestibular nucleus: an intracellular HRP study in the cat. I. Vestibulo-ocular neurons. *J Comp Neurol* 215:78-91.
- Mitsacos A, Reisine H, Highstein SM (1983), The superior vestibular nucleus: an intracellular HRP study in the cat. II. Non-vestibulo-ocular neurons. *J Comp Neurol* 215:92-107.
- Morawski M, Alpar A, Bruckner G, Fiedler A, Jager C, Gati G, Stieler JT, Arendt T (2009), Chondroitin sulfate proteoglycan-based extracellular matrix in chicken (*Gallus domesticus*) brain. *Brain Res* 1275:10-23.
- Morawski M, Bruckner G, Jager C, Seeger G, Arendt T (2010), Neurons associated with aggrecan-based perineuronal nets are protected against tau pathology in subcortical regions in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 169:1347-1363.
- Morawski M, Bruckner G, Jager C, Seeger G, Matthews RT, Arendt T (2012), Involvement of perineuronal and perisynaptic extracellular matrix in Alzheimer's disease neuropathology. *Brain Pathol* 22:547-561.
- Nagy V, Bozdagi O, Matynia A, Balcerzyk M, Okulski P, Dzwonek J, Costa RM, Silva AJ, et al. (2006), Matrix metalloproteinase-9 is required for hippocampal late-phase long-term potentiation and memory. *J Neurosci* 26:1923-1934.
- Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J (2008), Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Vet Med-Czech* 53:397-411.
- Nicholson C, Sykova E (1998), Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends Neurosci* 21:207-215.
- Ohline SM, Abraham WC (2017). Environmental enrichment effects on synaptic and cellular physiology of hippocampal neurons. *Neuropharmacology* 145, 3-12.
- Oohashi T, Edamatsu M, Bekku Y, Carulli D (2015), The hyaluronan and proteoglycan link proteins: Organizers of the brain extracellular matrix and key molecules for neuronal function and plasticity. *Exp Neurol* 274:134-144.
- Pajer K, Bellak T, Nogradi A (2021), Stem Cell Secretome for Spinal Cord Repair: Is It More than Just a Random Baseline Set of Factors? *Cells* 10. 2021 Nov 18;10(11):3214
- Pasqualetti M, Diaz C, Renaud JS, Rijli FM, Glover JC (2007), Fate-mapping the mammalian hindbrain: segmental origins of vestibular projection neurons assessed using rhombomere-specific *Hoxa2* enhancer elements in the mouse embryo. *J Neurosci* 27:9670-9681.
- Paxinos G and Watson Ch (1998) *The Rat Brain*. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Pizzorusso T, Fagiolini M, Gianfranceschi L, Porciatti V, Maffei L (2000), Role of neurotrophins in the development and plasticity of the visual system: experiments on dark rearing. *Int J Psychophysiol* 35:189-196.
- Pompeiano O, Brodal A (1957), Spinovestibular fibers in the cat; an experimental study. *J Comp Neurol* 108:353-381.
- Porter JD, Balaban CD (1997), Connections between the vestibular nuclei and brain stem regions that mediate autonomic function in the rat. *J Vestib Res* 7:63-76.
- Racz E, Gaal B, Kecskes S, Matesz C (2014), Molecular composition of extracellular matrix in the vestibular nuclei of the rat. *Brain Struct Funct* 219:1385-1403.
- Rastoldo G, El Mahmoudi N, Marouane E, Pericat D, Watabe I, Toneto A, Lopez-Juarez A, Chabbert C, et al. (2021), Adult and endemic neurogenesis in the vestibular nuclei after unilateral vestibular neurectomy. *Prog Neurobiol* 196:101899.
- Rathjen FG, Hodge R (2021), Early Days of Tenascin-R Research: Two Approaches Discovered and Shed Light on Tenascin-R. *Frontiers in Immunology* 11.
- Rauch U (2007), Brain matrix: structure, turnover and necessity. *Biochem Soc Trans* 35:656-660.

- Ritok A, Kiss P, Zaher A, Wolf E, Ducza L, Bacskai T, Matesz C, Gaal B (2022), Distribution and postnatal development of chondroitin sulfate proteoglycans in the perineuronal nets of cholinergic motoneurons innervating extraocular muscles. *Sci Rep* 12:21606.
- Romberg C, Yang SJ, Melani R, Andrews MR, Horner AE, Spillantini MG, Bussey TJ, Fawcett JW, et al. (2013), Depletion of Perineuronal Nets Enhances Recognition Memory and Long-Term Depression in the Perirhinal Cortex. *Journal of Neuroscience* 33:7057-7065.
- Röchlisch P (2014), Szövetan. *Medicina Kiadó*.
- Ruggiero DA, Mtui EP, Otake K, Anwar M (1996), Vestibular afferents to the dorsal vagal complex: substrate for vestibular-autonomic interactions in the rat. *Brain Res* 743:294-302.
- Ruigrok TJ, Voogd J (1990), Cerebellar nucleo-olivary projections in the rat: an anterograde tracing study with Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin (PHA-L). *J Comp Neurol* 298:315-333.
- Saghatelyan AK, Gorissen S, Albert M, Hertlein B, Schachner M, Dityatev A (2000), The extracellular matrix molecule tenascin-R and its HNK-1 carbohydrate modulate perisomatic inhibition and long-term potentiation in the CA1 region of the hippocampus. *Eur J Neurosci* 12:3331-3342.
- Saito Y, Takazawa T, Ozawa S (2008), Relationship between afterhyperpolarization profiles and the regularity of spontaneous firings in rat medial vestibular nucleus neurons. *Eur J Neurosci* 28:288-298.
- Sapieha PS, Duplan L, Uetani N, Joly S, Tremblay ML, Kennedy TE, Di Polo A (2005), Receptor protein tyrosine phosphatase sigma inhibits axon regrowth in the adult injured CNS. *Mol Cell Neurosci* 28:625-635.
- Seidenbecher CI, Gundelfinger ED, Bockers TM, Trotter J, Kreutz MR (1998), Transcripts for secreted and GPI-anchored brevican are differentially distributed in rat brain. *Eur J Neurosci* 10:1621-1630.
- Sekirnjak C, du Lac S (2006), Physiological and anatomical properties of mouse medial vestibular nucleus neurons projecting to the oculomotor nucleus. *J Neurophysiol* 95:3012-3023.
- Sekirnjak C, Vissel B, Bollinger J, Faulstich M, du Lac S (2003), Purkinje cell synapses target physiologically unique brainstem neurons. *J Neurosci* 23:6392-6398.
- Serafin M, de Waele C, Khateb A, Vidal PP, Muhlethaler M (1991), Medial vestibular nucleus in the guinea-pig. I. Intrinsic membrane properties in brainstem slices. *Exp Brain Res* 84:417-425.
- Shen X, Wang Z, Lu X, Jiang Z, Li W, Zhao X, Huang Z (2009), Neural signal sensing, transmission and functional regeneration on different toads' bodies. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc* 2009:5953-5956.
- Shin BS, Oh SY, Kim JS, Kim TW, Seo MW, Lee H, Park YA (2012), Cervical and ocular vestibular-evoked myogenic potentials in acute vestibular neuritis. *Clin Neurophysiol* 123:369-375.
- Shinder ME, Taube JS (2010), Differentiating ascending vestibular pathways to the cortex involved in spatial cognition. *J Vestib Res* 20:3-23.
- Shiroyama T, Kayahara T, Yasui Y, Nomura J, Nakano K (1999), Projections of the vestibular nuclei to the thalamus in the rat: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study. *J Comp Neurol* 407:318-332.
- Soleman S, Filippov MA, Dityatev A, Fawcett JW (2013), Targeting the neural extracellular matrix in neurological disorders. *Neuroscience* 253:194-213.
- Sonntag M, Blosa M, Schmidt S, Reimann K, Blum K, Eckrich T, Seeger G, Hecker D, et al. (2018), Synaptic coupling of inner ear sensory cells is controlled by brevican-based extracellular matrix baskets resembling perineuronal nets. *BMC Biol* 16:99.
- Sorg BA, Berretta S, Blacktop JM, Fawcett JW, Kitagawa H, Kwok JC, Miquel M (2016), Casting a Wide Net: Role of Perineuronal Nets in Neural Plasticity. *J Neurosci* 36:11459-11468.
- Sotelo C, Palay SL (1970), The fine structure of the later vestibular nucleus in the rat. II. Synaptic organization. *Brain Res* 18:93-115.
- Spicer AP, Joo A, Bowling RA, Jr. (2003), 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* 278:21083-21091.
- Spicer AP, McDonald JA (1998), Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family. *Journal of Biological Chemistry* 273:1923-1932.

- Srinivasan J, Schachner M, Catterall WA (1998), Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15753-15757.
- Straka H, Vibert N, Vidal PP, Moore LE, Dutia MB (2005), Intrinsic membrane properties of vertebrate vestibular neurons: function, development and plasticity. *Prog Neurobiol* 76:349-392.
- Suarez C, Gonzalez del Rey C, Tolivia J, Llorente JL, Diaz C, Navarro A, Gomez J (1993), Morphometric analysis of the vestibular complex in the rat. *Laryngoscope* 103:762-773.
- Sykova E, Nicholson C (2008), Diffusion in brain extracellular space. *Physiol Rev* 88:1277-1340.
- Szarvas D, Gaal B, Matesz C, Racz E (2018), Distribution of the Extracellular Matrix in the Pararubral Area of the Rat. *Neuroscience* 394:177-188.
- Szentágothai J (1971), *Funkcionális Anatómia I-III*. Medicina Kiadó.
- Szigeti ZM, Matesz C, Szekely G, Felszeghy S, Bacskai T, Halasi G, Meszar Z, Modis L (2006), Distribution of hyaluronan in the central nervous system of the frog. *J Comp Neurol* 496:819-831.
- Takazawa T, Saito Y, Tsuzuki K, Ozawa S (2004), Membrane and firing properties of glutamatergic and GABAergic neurons in the rat medial vestibular nucleus. *J Neurophysiol* 92:3106-3120.
- Tan CL, Kwok JC, Patani R, Ffrench-Constant C, Chandran S, Fawcett JW (2011), Integrin activation promotes axon growth on inhibitory chondroitin sulfate proteoglycans by enhancing integrin signaling. *J Neurosci* 31:6289-6295.
- Tani E, Ametani T (1971), Extracellular distribution of ruthenium red-positive substance in the cerebral cortex. *J Ultrastruct Res* 34:1-14.
- Thalhammer A, Cingolani LA (2014), Cell adhesion and homeostatic synaptic plasticity. *Neuropharmacology* 78:23-30.
- Tighilet B, Brezun JM, Sylvie GD, Gaubert C, Lacour M (2007), New neurons in the vestibular nuclei complex after unilateral vestibular neurectomy in the adult cat. *Eur J Neurosci* 25:47-58.
- Tighilet B, Lacour M (2001), Gamma amino butyric acid (GABA) immunoreactivity in the vestibular nuclei of normal and unilateral vestibular neurectomized cats. *Eur J Neurosci* 13:2255-2267.
- Toole BP (2004), Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer* 4:528-539.
- Tropea D, Caleo M, Maffei L (2003), Synergistic effects of brain-derived neurotrophic factor and chondroitinase ABC on retinal fiber sprouting after denervation of the superior colliculus in adult rats. *Journal of Neuroscience* 23:7034-7044.
- Tsilibary E, Tzinia A, Radenovic L, Stamenkovic V, Lebitko T, Mucha M, Pawlak R, Frischknecht R, et al. (2014), Neural ECM proteases in learning and synaptic plasticity. *Prog Brain Res* 214:135-157.
- Vafadari B, Salamian A, Kaczmarek L (2016), MMP-9 in translation: from molecule to brain physiology, pathology, and therapy. *J Neurochem* 139 Suppl 2:91-114.
- Vibert N, Serafin M, Crambes O, Vidal PP, Muhlethaler M (1995), Dopaminergic agonists have both presynaptic and postsynaptic effects on the guinea-pig's medial vestibular nucleus neurons. *Eur J Neurosci* 7:555-562.
- Vidal PP, de Waele C, Vibert N, Muhlethaler M (1998), Vestibular compensation revisited. *Otolaryngol Head Neck Surg* 119:34-42.
- Vo T, Carulli D, Ehlert EM, Kwok JC, Dick G, Mecollari V, Moloney EB, Neufeld G, et al. (2013), The chemorepulsive axon guidance protein semaphorin3A is a constituent of perineuronal nets in the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci* 56:186-200.
- Walberg F (1972), Cerebellovestibular relations: anatomy. *Prog Brain Res* 37:361-376.
- Walimbe T, Panitch A (2020), Best of Both Hydrogel Worlds: Harnessing Bioactivity and Tunability by Incorporating Glycosaminoglycans in Collagen Hydrogels. *Bioengineering (Basel)* 7.
- Wang D, Fawcett J (2012), The perineuronal net and the control of CNS plasticity. *Cell Tissue Res* 349:147-160.
- Weber P, Bartsch U, Rasband MN, Czaniera R, Lang Y, Bluethmann H, Margolis RU, Levinson SR, et al. (1999), Mice deficient for tenascin-R display alterations of the extracellular matrix and decreased axonal conduction velocities in the CNS. *J Neurosci* 19:4245-4262.

- Wei H, Chen ZY, Koivisto A, Pertovaara A (2021), Spinal mechanisms contributing to the development of pain hypersensitivity induced by sphingolipids in the rat. *Pharmacological Reports* 73:672-679.
- Wiemann S, Yousf A, Joachim SC, Peters C, Mueller-Buehl AM, Wagner N, Reinhard J (2021), Knock-Out of Tenascin-C Ameliorates Ischemia-Induced Rod-Photoreceptor Degeneration and Retinal Dysfunction. *Front Neurosci* 15:642176.
- Wilczynski GM, Konopacki FA, Wilczek E, Lasiecka Z, Gorlewicz A, Michaluk P, Wawrzyniak M, Malinowska M, et al. (2008), Important role of matrix metalloproteinase 9 in epileptogenesis. *J Cell Biol* 180:1021-1035.
- Xiao ZC, Ragsdale DS, Malhotra JD, Mattei LN, Braun PE, Schachner M, Isom LL (1999), Tenascin-R is a functional modulator of sodium channel beta subunits. *J Biol Chem* 274:26511-26517.
- Yamada H, Watanabe K, Shimonaka M, Yamaguchi Y (1994), Molecular cloning of brevicin, a novel brain proteoglycan of the aggrecan/versican family. *J Biol Chem* 269:10119-10126.
- Yamanaka T, Him A, Cameron SA, Dutia MB (2000), Rapid compensatory changes in GABA receptor efficacy in rat vestibular neurones after unilateral labyrinthectomy. *J Physiol* 523 Pt 2:413-424.
- Yuan W, Matthews RT, Sandy JD, Gottschall PE (2002), Association between protease-specific proteolytic cleavage of brevicin and synaptic loss in the dentate gyrus of kainate-treated rats. *Neuroscience* 114:1091-1101.
- Zimmermann DR, Dours-Zimmermann MT (2008), Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge. *Histochem Cell Biol* 130:635-653.
- Zimmermann DR, Ruoslahti E (1989), Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican. *EMBO J* 8:2975-2981.

## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

A tenascin-R és brevican átmeneti, immunreaktivitás csökkenését tapasztaltuk az agytörzsi vestibularis magkomplexumban. Az perineuronális ECM környezet a postoperatív 1-7. napokon mutatott radikális csökkenést mindkét vizsgált matrix molekula esetében. Míg a tenascin-R a laesiot követő 3-7. napokon mutatott szignifikáns csökkenést, a brevican esetében az 1-7. postoperatív napokon láttunk szignifikáns eltérést a kontroll állatokéhoz képest. Az állatok postoperatív viselkedésvizsgálata során párhuzamot találtunk a tenascin-R és brevican immunreaktivitási szintjei és a funkciók javulás között. A 14. műtét utáni napon a perineuronális hálók immunreaktivitása megegyezett a kiindulási értékekkel, valamint a laesio tünetei is nagyrészt helyreálltak.

A kompenzáció eredményessége több intra- és extracelluláris esemény szimultán lezajlását igényli, közöttük, feltételezésünk szerint, az ECM környezet átmeneti permisszív karakterisztikáját, mely komplex folyamat és a teljes vestibularis neuronhálózatra kiterjed: első- és másodrendű vestibularis neuronok synapsisa; másodrendű neuronok intrinsic fiziológiája; commissuralis gátlás hatása; valamint a környező glia befolyása.

A chondroitin-sulfat proteoglycanokban gazdag PNN a központi idegrendszerben non-permisszív perisomaticus környezetet tart fent, mely a pályarendszerek strukturális újránövekedése számára fizikai barriert képez. Dinamikussága azonban a funkcionális adaptációkat nem gátolja, sőt a következő plasztikus változásokat facilitálja: **(I) LTP és LTD:** synapticus morfofunkcionális módosulások a pre- és postsynapticus compartmentekben, amelyek befolyásolják a neurotranszmisszió erősségét. **(II) Homeosztatis plaszticitás:** synapticus ingerületátvitel finomhangolása destabilizáló hatások ellensúlyozására, mint synapsisok számának csökkenése, serkentés és gátlás arányának balanszírozása nagy funkcionális hálózatok szintjén. Valamint a **(III) Metaplaszticitás:** "plaszticitás plaszticitása", az ingerület áttevődés hatékonyságát változtató intrinsic lehetőségek változásai.

Az ECM befolyásolja a NMDA receptorok és L-típusú  $Ca^{2+}$  csatornák működését plasztikus adaptációkban, AMPA dinamizmust, perisomaticus GABA-erg neurotranszmissziót, valamint astrocyták működését.

Kutatásunk alapját képezheti további neuronális plaszticitási munkáknak, melyek humán vonatkozása is egyre inkább előtérbe kerül a KIR élettani és kórélettani eseményeinek jobb megértésében, esetleg ideggyógyászati és idegsebészeti rehabilitáció eredményességében, és a pszichiai betegségek megértésében.

## SUMMARY

A transient decrease in tenascin-R and brevican immunoreactivity was experienced in the brainstem vestibular nuclear complex following unilateral labyrinthine damage. The perineuronal ECM environment showed a radical decrease in both examined matrix molecules in the postoperative days 1-7. While tenascin-R demonstrated a significant decrease in the 3-7 postoperative days following the lesion, brevican showed a significant difference compared to the control animals in the 1-7 postoperative days. During the postoperative behavioral examination, a parallel was found between the tenascin-R and brevican immunoreactivity levels and functional improvement. On the 14th postoperative day, the immunoreactivity of the perineuronal networks was the same as the baseline values, and the lesion symptoms had also largely recovered.

The effectiveness of compensation requires the simultaneous occurrence of multiple intra- and extracellular events. Among these, our assumption is that the **transient permissive characteristics of the extracellular matrix** play a crucial role. This complex process extends to the entire vestibular neuron network, including **first- and second order vestibular neurons' synapses**, the **intrinsic physiology of second-order neurons**, the impact of **commissural inhibition**, and the influence of **surrounding glia**.

The **perineuronal net**, rich in **chondroitin sulfate proteoglycans**, maintains a non-permissive neuropil in the central nervous system. This structure impedes the structural regrowth of **KIR pathways**. However, it does not inhibit functional plasticity; in fact, it promotes the following plastic changes: (I) **LTP and LTD**: synaptic morphofunctional modifications of the pre- and postsynaptic compartments that influence the strength of neurotransmission. (II) **Homeostatic Plasticity**: It fine-tunes synaptic transmission to counterbalance destabilizing effects, such as changes in the number of synapses or the balance between excitation and inhibition at the level of large functional networks. (III) **Metaplasticity**: intrinsic changes that alter the efficiency of information transfer.

The **extracellular matrix** influences plastic adaptations by affecting the function of **NMDA receptors**, **L-type Ca<sup>2+</sup> channels**, **perisomatic GABAergic inhibition**, and **astrocytic function**.

Our research could serve as the foundation for further studies on **neuronal plasticity**, with increasing relevance to human aspects. Understanding the physiological and pathophysiological events of the **vestibular system** becomes more crucial. This knowledge

may contribute to the effectiveness of **neurological and neurosurgical rehabilitation** and enhance our understanding of **psychiatric disorders**.

## 9. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

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

Jelölt: Magyar Ágnes  
Doktori Iskola: Fogorvostudományi Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

### További közlemények

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





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

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

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

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

Debrecen, 2024.04.02.



## **10. TÁRGYSZAVAK**

vestibularis rendszer; agytörzs; extracellularis matrix; perineuronális háló; synapticus plaszticitás;  
vestibularis kompenzáció; viselkedésvizsgálat

## **KEYWORDS**

vestibular system; brainstem; extracellular matrix; perineuronális háló; synaptic plasticity;  
vestibular compensation; behavioral analysis

## 11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Klinikusként a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetének **Dr. Matesz Klára** professzor asszony által vezetett agytörzsi munkacsoport kísérlet sorozatába 2014-ben kapcsolódhattam be. Nagy hálával tartozom Professzor Nőnek, korábbi témavezetőmnek, aki hatalmas szakmai tapasztalattal és egyidejűleg nagy türelemmel vezetett be a kísérleti állatok műtéteinek, a szövettani feldolgozás és értékelés rejtelseibe. A FODI oktatójaként és az Anatómiai Intézet kvalifikált munkatársaként elismert **Dr. Gaál Botond** egyetemi adjunktus vezetésével folytathattam a kutatást 2021-ben, akinek ezúton is nagy köszönettel tartozom, amiért lehetővé tette a PhD értekezés elkészülését, amiért nem engedte, hogy feladjam az értekezés megírását a sokszor végeláthatatlan klinikai terhelés mellett. Az agytörzsi munkacsoportból külön köszönet illeti **Dr. Rácz Éva** egyetemi adjunktust, akinek korábbi hozzájárulása alapjául szolgált jelen kutatásnak is.

Továbbá köszönetemet szeretném kifejezni az Anatómia Intézet korábbi vezetőjének, **Dr. Antal Miklós** egyetemi tanárnak és jelenlegi igazgatójának, **Dr. Szűcs Péter** egyetemi docensnek, és az agytörzsi munkacsoport jelenlegi vezetőjének **Dr. Birinyi András** egyetemi docensnek, hogy lehetővé tették a kísérletek lebonyolítását az intézet keretein belül.

A szövettani feldolgozásban hathatós segítséget nyújtó **Horváth Tímeának** a kísérletek technikai kivitelezésében nyújtott segítségével szintén köszönetemet fejezem ki.

## **12. FÜGGELÉK**

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények.