

**AZ EXTRACELLULARIS MATRIX MOLEKULÁK SZEREPE A
NERVUS OPTICUS REGENERÁCIÓBAN BÉKÁBAN**

MÁTHÉNÉ SZIGETI ZSUZSA



EGYETEMI DOKTORI (Ph. D.) ÉRTEKEZÉS

TÉMAVEZETŐK: DR. MÓDIS LÁSZLÓ, DR. MATESZ KLÁRA

**Debreceni Egyetem
OEC, Általános Orvostudományi Kar**

Debrecen, 2006

TARTALOMJEGYZÉK

A dolgozatban előforduló rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés	7
2. Irodalmi áttekintés	9
2.1. A nervus opticus felépítése, centrális kapcsolatai	9
2.2. A látóideg regeneráció folyamata az alacsonyabbrendű gerincesekben	12
2.3. Az idegi regeneráció mechanizmusa	13
2.3.1. A látóideg regeneráció molekuláris mechanizmusa alacsonyabbrendű gerincesekben	14
2.3.2. Az ECM makromolekulái az idegrendszerben, feltételezett szerepük	16
2.3.2.1. Hyaluronsav	16
2.3.2.2. Tenascin	18
2.3.2.3. Fibronektin	20
2.3.3. A perineuronális háló (perineuronal net, PN)	21
2.3.4. A átmeneti zóna	22
3. Célkitűzés	23
4. Anyag és módszer	24
4.1. A hyaluronsav kimutatása	24
4.2. A tenascin-C kimutatása	25
4.3. A fibronektin kimutatása	25
4.4. Szemikvantitatív és kvantitatív analízisek	25
4.5. Nervus opticus regenerációs vizsgálatok	26
5. Eredmények	28
5.1. A béka központi idegrendszerének hyaluronsav térképe	28
5.1.1. Kvantitatív analízis	37
5.2. A béka központi idegrendszerének tenascin-C térképe	39
5.2.1. Kvantitatív analízis	47
5.3. A béka központi idegrendszerének fibronektin térképe	48
5.4. Nervus opticus regenerációs vizsgálatok	55
5.4.1. A hyaluronsav reakció változása a béka látóközpontjában a regeneráció során	55
5.4.2. A tenascin-C reakció változása a béka látóközpontjában a regeneráció során	60
6. Megbeszélés	65
6.1. A HA megoszlása a béka központi idegrendszerében	65

6.2. A tenascin-C megoszlása a béka központi idegrendszerében	67
6.3. A fibronectin megoszlása a béka központi idegrendszerében	68
6.4. A HA, tenascin-C és fibronectin eloszlási mintázatának összehasonlítása a béka idegrendszerében	69
6.5. Nervus opticus regenerációs vizsgálatok	72
6.5.1. A HA reakció változása a béka látóközpontjaiban regeneráció során	72
6.5.2. A tenascin-C reakció változása a béka látóközpontjaiban regeneráció során	74
6.6. A HA és a tenascin-C lehetséges szerepe a nervus opticus regenerációjában	75
7. Összefoglalás, eredmények jelentősége	78
8. Summary	79
9. Köszönetnyilvánítás	80
10. Irodalomjegyzék	81
11. Saját közlemények jegyzéke	93

A dolgozatban előforduló rövidítések jegyzéke

3.	ventriculus tertius
4.	ventriculus quartus
Ad	tegmen tum mesencephali, nucleus anterodorsalis
A	nucleus anterior thalami
apl	amygdala pars lateralis
apm	amygdale pars medialis
apo	area preoptica anterior
Av	tegmen tum mesencephali, nucleus anteroventralis
bHABP	biotinilált HA kötő próba
boa	bulbus olfactorius accessorius
BON	nucleus opticus basalis
ca	commissura anterior, telencephalon
CA	commissura anterior, gerincvelő
C	nucleus centralis thalami
Cc	canalis centralis
CD	cornu dorsale
CGL	corpus geniculatum laterale
co, oc	chiasma opticum
cot	torus semicircularis, nucleus commissuralis
cpal	commissura pallii
CV	cornu ventrale
dH	habenula dorsalis
dp	pallium dorsale
ECM	extracellularis matrix
FP	foszfát puffer
FR	formatio reticularis
fs	fasciculus solitarius
gl	stratum glomerulare
Hy	nucleus hypothalamicus
ig	stratum granulosum internum
lfb	lateralis elő agyi köteg
Lpd	nucleus lateralis thalami, pars posterodorsalis
Lpv	nucleus lateralis thalami, pars posteroventralis
lt	torus semicircularis, nucleus laminaris
mfb	mediális elő agyi köteg

mg	nucleus preopticus magnocellularis
ml	stratum mitrale
mn	motoneuron
mt	torus semicircularis, nucleus magnocellularis
nB	nucleus Bellonci
nc	nucleus cochlearis
ni	nucleus isthmi
nvl	nucleus vestibularis lateralis
nVm	nervus trigeminus motoros ága
no, on	nervus opticus
nspV	nucleus spinalis nervi trigemini
nV	nervus trigeminus
nVIII	nervus vestibulocochlearis
nVs	nervus trigeminus szenzoros ága
nvs	nucleus vestibularis superior
olfb	bulbus olfactorius
olfn	nervus olfactorius
os	oliva superior
ot	tectum opticum
P	nucleus posterior thalami
FPS	foszfát puffer
pd	pallium dorsale
pl	pallium laterale
pm	pallium mediale
PN	perineuronális háló
pt	torus semicircularis, nucleus principalis
RD	radix dorsalis
RV	radix ventralis
sc	nucleus suprachismatis
SG	stratum ganglionare, cerebellum
SGr	stratum granulosum, cerebellum
SM	stratum moleculare, cerebellum
sm	nucleus septalis medialis
sr	striatum rostrale
sv	striatum ventrale
tec	tectum opticum
tel	telencephalon

to, otr	tractus opticus
tp	tuberculum posterior
TRK	tirozin kináz receptor
tspV	tractus spinalis nervi trigemini
TZ	átmeneti zóna
vH	habenula ventralis
vl	ventriculus lateralis
VL	nucleus ventrolateralis thalami
VM	nucleus ventromedialis thalami
vo	ventriculus opticus
IV	nuclei nervus trochlearis
V	nuclei nervus trigemini
VI	nuclei nervus abducenti
VIII	nuclei nervus vestibulocochlearis
X	nuclei nervus vagi
XII	nuclei nervus hypoglossi

1. BEVEZETÉS

Balesetek és betegségek során gyakran sérül a központi idegrendszer, valamint a környéki idegrendszerhez tartozó agyidegek és gerincvelői idegek. Emlősökben csak a környéki idegrendszerben van lehetőség a sérült ideg regenerációjára, amennyiben a sérült végeket sebészetileg egyesítik. Ezzel szemben a központi idegrendszer a sérülést követően nem képes regenerációra és a perifériás idegek sem képesek a központi idegrendszerbe benőni. A regeneráció elmaradásának oka lehet a gliális hegszövet kialakulása, a lamina basalis hiánya és a sérült axonok számára nem megfelelő molekuláris környezet.

Az emlősökkel szemben a halak, kétélűek és hüllők esetében az idegrendszer különböző területén írtak le regenerációt. A nervus opticus átvágása után a retina axonjai benőnek a látóközpontokba, és az állat látása funkcionális vizsgálatok eredményei szerint visszatér (Gaze, 1970; Murray és Edwards, 1982; Jacobson, 1991; Dunlop és mtsai., 1997; Dunlop és mtsai., 2000). A nervus vestibulocochlearis sérülése után kialakult egyensúly- és hallászavarok bizonyos idő után megszűnnek, és a regeneráció szövettanilag is kimutatható (Brodal és mtsai., 1962; Newman és mtsai., 1986). Az átvágott és újraegyesített gerincvelői dorsalis gyökér képes benőni a gerincvelőbe, ahol a terminálisok funkcionális kapcsolatot alakítanak ki (Liuzzi és Lasek, 1983, 1985; Ramer és mtsai., 2001). Mindezek az adatok arra utalnak, hogy az alacsonyabbrendű gerincesek esetében a regenerálódó axon mikrokörnyezete eltér az emlősökben található non-permisszív környezettől.

Az utóbbi néhány évtizedben vált világossá, hogy a regenerálódó rostokat targetjeik elérésében különböző molekuláris mechanizmusok segítik. Ezeknek a folyamatoknak résztvevői az extracellularis matrix (ECM) makromolekulái, amelyek az axon növekedési kúp felszínén lévő sejtadhéziós molekulákkal (CAM) kölcsönhatásba kerülve a citoszkeletonon keresztül különböző jelátviteli folyamatokat szabályozhatnak és módosíthatják a génexpressziót. Mindezeknek a folyamatoknak az eredőjeként az ECM makromolekulái permisszív vagy non-permisszív szerepet játszhatnak az idegi regenerációban, az idegrendszer kialakulásában, fejlődésében, érési folyamataiban. Számos, elsősorban *in vitro* kísérletek eredményei alapján született adat ellenére az ECM makromolekuláinak szerepe ma sem ismert az idegi regenerációban (Toole, 1982; Ripellino és mtsai., 1988; Noble, 2002).

A béka látórendszere az ECM makromolekuláinak az idegi regenerációban betöltött szerepének tanulmányozására alkalmas *in vivo* modell. A regeneráció időbeli lefolyása, fiziológiai, magatartási és neuronális jelölési vizsgálatok alapján jól ismert, ezért az ECM

expressziójának változásai és a regeneráció lefolyása között feltételezhető korreláció könnyen megállapítható.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

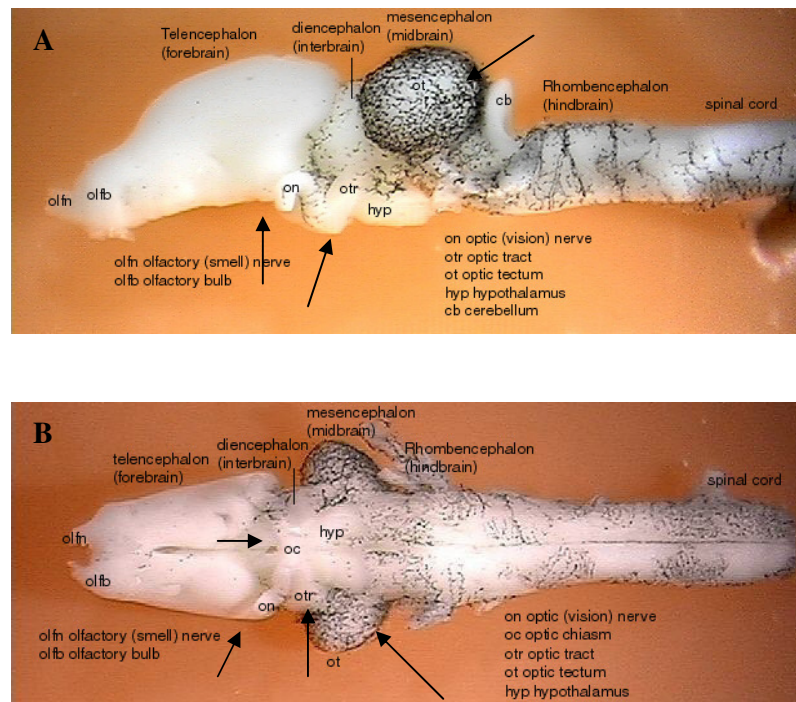
2.1. A nervus opticus felépítése, centrális kapcsolatai

Az állatok érzékszerveik révén szereznek információt környezetükről és benne elfoglalt helyükről. Érzékszerveik közül az egyik legfontosabb a látószerv, ami már gerinctelen csoportoknál is nagyfokú fejlettséget ér el, az ízeltlábúaknál és fejlábúaknál. A fejlábúaknál már a gerinceseknél széles körben elterjedt hólyagszem kevésbé fejlett változata található meg.

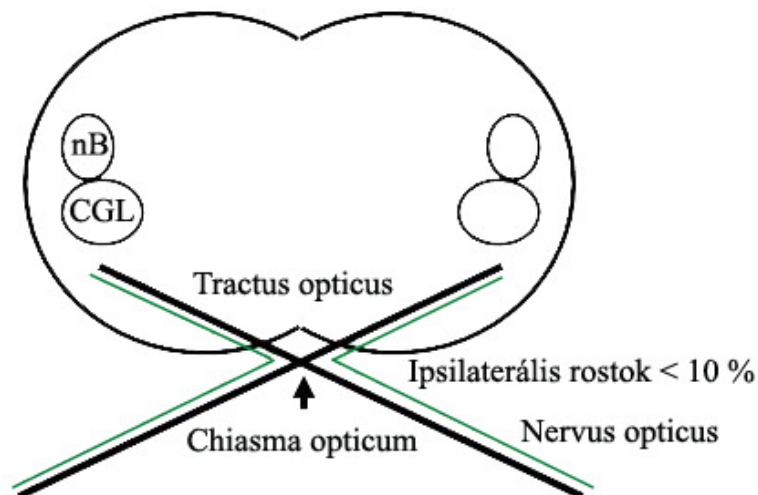
A szemük révén a halak, kétéltűek és hüllők még csak fényt-árnyékot érzékelnek, és alakot látnak, és csak a madarak és emlősök között találkozhatunk olyan fajokkal, melyek szín érzékelésére is képesek. A kétéltűek, ezen belül is a békák látórendszeréről a XIX. századból származnak az első leírások. Először a retina sejtjeit írták le (Schultze, 1867). A béka (*Rana esculenta*) nervus opticus a többi gerinceshez hasonlóan a retina ganglionsejtjeinek axonjait tartalmazza. A retina és a nervus opticus fejlődéstanilag a központi idegrendszer részének tekinthető. A ganglionsejtek axonjainak 0-14 %-a myelinizált (Roth és mtsai., 1993), a myelin kialakításáért a kis számban előforduló oligodendrocytak felelősek (Blanco és Orkland, 1996). Az axon kötegeket az astroglia nyúlványaiból kialakuló lemezek választják el egymástól. Az astrocyta nyúlványok az ideg perifériás részén találkoznak a lamina basalis mentén és kialakítják a glia limitanst.

A XIX. század végén és a XX. század első felében már részletesen leírták a béka központi idegrendszerét (Gaupp, 1899; Rothig, 1923) és a látórendszerét (Bellonci, 1888; Herrick, 1925; Frontera, 1952). A nervus opticus és a folytatásaként megtalálható tractus opticus útvonalát a diencephalonban (Lázár, 1971; Scalia és Fite, 1974; Lázár, 1978) és a mesencephalonban (Lázár és Székely, 1967, 1969; Potter, 1969, 1972; Székely, 1976) elhelyezkedő targetjeihez a XX. század második felében írták le (1. ábra).

A békákban a nervus opticus axonjainak több, mint 90 %-a átkereszteződik a chiasma opticumban (2. ábra), emberben ez az arány 50% (Dunlop és Beazley, 1984). Az átkereszteződés után a rostok nagy része a tractus opticusban halad tovább a thalamus lateralis felszínén a diencephalon és a tectum opticum felé. A tectum opticumot elérve a rostok mediodorsalis és ventrolateralis kötegekre oszlanak és körbeveszik a tectum féltekék szélét. Az optikus projekció mind a diencephalicus, mind a mesencephalicus látóközpontokban retinotopikus elrendezésben figyelhető meg (Montgomery és Fite, 1989).



1. A-B. ábra. Béka agy laterális (A) és ventralis képe (B). A nyilak jelölik a látás szempontjából fontos képleteket a nervus opticut (on), tractus opticut (otr), chiasma opticumot (oc) és a tectum opticumot (ot). (soma.npa.uiuc.edu)

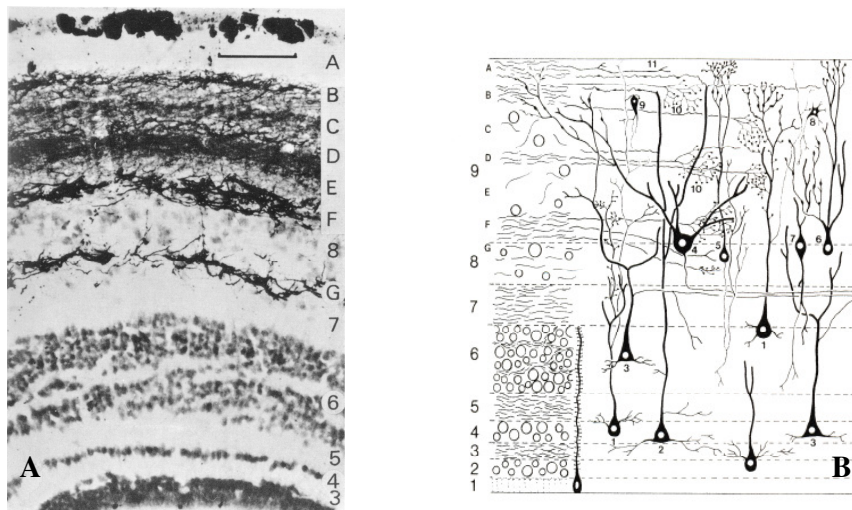


2. ábra. A béka agy sematikus rajza a diencephalon szintjében a chiasma opticummal. Nucleus Bellonci (nB) és corpus geniculatum laterale (CGL).

A retinából csak kontralateralis rostokat fogad a nagysejtes nucleus preectalis és a tectum opticum (Scalia, 1973; Currie, 1974; Currie és Cowan, 1974; Scalia és Colman, 1974). Az átkereszteződés után alakul ki a tractus opticus accessorius, mely a diencephalon ventralis oldalán haladva eljut a nucleus opticus basalisba, ami a hypothalamus és a mesencephalon ventralis tegmentuma közötti átmenet közelében található, és csak kontralateralis rostokat fogad.

A tractus opticus rostjainak végződési területei a **diencephalonban** a nucleus Bellonciban, a corpus geniculatum lateraleban (thalami), a nucleus preopticusban, a nucleus posterior thalamiban és a nucleus suprachiasmatisban találhatók (Lázár és Székely, 1967).

A diencephalon a tectum opticumból fogad még vizuális bemenetet. Acusticus afferensek a torus semicircularisból, oliva superiorból és a lemniscus lateralisból (Hall és Feng, 1987; Neary, 1988; Feng és Lin, 1991), míg szomatoszenzoros információk a gerincvelőből és a trigeminalis rendszerből érkeznek (Muñoz és mtsai., 1992, 1994, 1997).



3. ábra. A tectum opticum rétegei számmal és betűvel jelölve látható cobalt-lysin jelöléssel (A) (Lázár, 1978) és Golgi festéssel (B) (Székely és Lázár, 1976).

A **mesencephalonban** a tractus opticus a tectum opticumban végződik (3. A-B ábra). A tectum opticum kilenc fő rétegből, és a 9. réteg ezen belül hét alrétegből épül fel. A kontralateralis opticus rostok főleg a B, D, F és G alrétegeiben végződnek, de az A, C és E rétegek is fogadnak közvetlen opticus bemenetet (Knapp és mtsai., 1965). Közvetett vizuális bemenetet kap a tectum opticum 8. és A rétege mindkét oldali nucleus isthmiből, amely a tegmentum mesencephali caudalis részén található. A nucleus isthmi a retinából nem kap

közvetlen bemenetet, csak az azonos oldali tectum opticumon keresztül (Grobstein és Comer, 1983; Tóth és mtsai., 1994). A tectum opticum ezen kívül acusticus és vestibularis bemenetet is kap, melyek a 2. és a 4. rétegekben végződnek (Gorlick és mtsai., 1984), valamint a gerincvelő hátsó szarvából kap szenzoros bemenetet. A tectum opticum efferenseinek egy része, a tectothalamicus rostok rostralis irányba a diencephalon kontra- és ipsilateralis struktúrái, a nucleus Bellonci és a corpus geniculatum laterale felé haladnak. Az azonos oldali nucleus isthmibe is vetülnek a tectum opticum 8. rétegéből származó rostok. Tectobulbospinalis rostok a gerincvelő szürkeállományában és az agytörzsi formatio reticularis medialisban végződnek. Efferenseket küld a tectum az oliva superiorba és a formatio reticularis lateralisba (Tóth és mtsai., 1985). A béka látórendszerében a tectum opticum központi helyet foglal el, mivel a telencephalicus agykéreg hiányában ez a legmagasabb rendű látóközpont.

2.2. A látóideg regeneráció folyamata az alacsonyabbrendű gerincesekben

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy békában, más alacsonyabbrendű gerinceshez hasonlóan nemcsak a környéki idegrendszer, hanem a központi idegrendszer bizonyos részei is képesek sérülés utáni regenerációra (Sperry, 1951; Gaze, 1970; Beazley, 1984; Liuzzi és Lasek, 1985; Jacobson, 1991). A látóideg-regenerációs kísérletek során átvágták a béka egyik vagy mindkét oldali nervus opticusát (Bohn és Stelzner, 1981a, b, c; Stelzner és mtsai., 1981) és követték a regeneráció folyamatát. Megfigyelték, hogy a regenerálódó axonok a második posztoperatív héten eljutnak a chiasma opticumig, majd a harmadik-negyedik posztoperatív héten a diencephalonig. Az ötödik-hatodik posztoperatív héten a rostok elérik a tectum caudalis részét, a nucleus opticus basalist és a hatodik-nyolcadik posztoperatív hétre minden diencephalikus és mesencephalikus targetet reinnerválnak (Stelzner és mtsai., 1981). Abban az esetben, amikor a békának csak az egyik oldali látóidegét vágják át, megfigyelhető, hogy a regenerálódó axonok egy része a chiasma opticum után nem a tractus opticusban folytatja útját, hanem a másik szem retinája felé halad (Bohn és Stelzner, 1981a, b). Amikor mindkét oldali nervus opticust átvágták, az „eltévedő” axonok száma csökkent (Bohn és Stelzner, 1981c).

Halakban, kételtűekben a nervus opticus sérülésekor a degenerálódott axonok még három hónappal a sérülés után is megtalálhatók az idegben (Blanco és mtsai., 1993). Az ideg regeneráció során először makrofágok halmozódnak fel a regenerációs blastémában, az ideg proximalis végénél (Blanco és Orkland, 1996). A sérülés helyére glia sejtek vándorolnak,

melyek astrocytaszerű sejtekké differenciálódnak (Blaugrund és mtsai., 1993). Strobel és Stuermer (1994) kimutatta, hogy az aranyhal látóidegének növekedési kúpja számos struktúrával érintkezik a regeneráció során, így a degenerálódó myelinnel, astrocytákkal, lamina basaliszal és az ECM-mel. Az axon növekedési régióban mindig megtalálható az astrocyta. Az astrocyták, amelyek a kétélűek nervus opticus széli részén láthatók abban különböznek az emlőstől, hogy nyúlványaik között desmosomák találhatók (Blanco és Orkland, 1996). Ehhez a desmosomához cytokeratin tartalmú intermedier filamentumok kapcsolódnak, míg emlősökben GFAP (glial filament acidic protein) az intermedier filamentumokat felépítő fehérje (Rungger-Brändle és mtsai., 1989). Az átvágott és regenerálódó nervus opticus növekedési zónájában található regenerálódó axonok myelinizáltak, szemben a normál békával, ahol az axonoknak csak 3%-a myelinizált (Blanco és Orkland, 1996).

2.3. Az idegi regeneráció mechanizmusa

Az idegi regeneráció során a sérült axon distalis végén kialakul az axon növekedési kúp (growth cone, GC), amely ma még nem teljesen ismert módon éri el a targetet. A növekedési kúp mozgásának irányításában legalább négyféle mechanizmust tételeznek fel (Reichardt és Tomaselli, 1991): az érintkezés által közvetített vonzást, az érintkezéssel közvetített taszítást, a kémiai erők által történő vonzást és a kémiai erők által történő taszítást. Ha az irányító, pozitív (permisszív vagy attraktív) vagy negatív (gátló vagy repulzív) jelző molekulák valamely felszínhez kötöttek, vagy az extracellularis matrixban rögzülnek, rövidtávú hatást fejtenek ki a növekedési kúpra. Ha azonban ezek a molekulák diffúzibilisek és egy gradienst képeznek, hosszú távon érvényesülhet a hatásuk. A valóságban azonban a két mechanizmus nem válik el egymástól, mivel a szekretált, diffúzibilis molekula is kötődhet valamilyen felszínhez. Az axon növekedésének különböző periódusaiban a különböző mechanizmusok kombinálódhatnak egymással.

Az axonok kémiai anyagok által történő irányított növekedésének gondolatát Sperry (1963) írta le először és kemiospecificitásnak nevezte, a növekvő axonok "homingját" "differenciált kémiai vonzás"-nal magyarázta. Az 1970-es években, szövettenyészetben kimutatták, hogy a különböző adhéziós hatások fontos szerepet játszanak a növekedési kúp irányításában. Edelman írta le 1985-ben hogy az axon növekedését és a target felismerését az ún. sejtadhéziós molekulák (cell adhesion molecule, CAM) kontrollálják, amelyek a növekedési kúp és a target sejt felszínén expresszálódnak. Az azóta eltelt időben a CAM-ok

számos típusát azonosították. Az irányító molekulák nemcsak a felszínen expresszáldó molekulák lehetnek, hanem a növekedési kúp környezetében lévő extracellularis matrix makromolekulái és különböző kis molekulájú, diffúzibilis faktorok. Ez utóbbiak lehetnek a különböző növekedési faktorok, valamint a neurotranszmitterek, amelyek már a szinapszisok kialakulása előtt ürülnek a növekedési kúFPól.

2.3.1. A látóideg regeneráció molekuláris mechanizmusa alacsonyabb rendű gerincesekben

A látóideg regeneráció során a regeneráldó axonok útkeresésének és targetjeik megtalálásának okairól többféle hipotézis született, amelyekben különböző molekulacsoportok jelenlétét vagy hiányát ill., koncentrációjának változását tartják fontosnak.

Az egyik csoportot a **neurotrophin család** különböző tagjai alkotják. Ide tartoznak a neurotrofinok (NT-3, NT-4/5, NT-6 ÉS NT-7) (von Bartheld, 1998) és a növekedési faktorok, amelynek tagjai a NGF (neurotrop growth factor) és a BDNF (brain-derived neurotrophic factor). Receptorai a tirozin kináz (TRK) családba tartoznak, legnagyobb affinitással a TRKC-hez kötődnek a látórendszerben. A neurorophinok békában a retinában szintetizáldódnak és innen anterográd transzporttal jutnak el a tectumba (Duprey-Diaz és mtsai., 2003). Nervus opticus átvágás után a tectumban a NT-3 koncentrációja csökken, míg a TRKC koncentráció nő, ez kompenzálhatja a NT-3 alacsony koncentrációját.

A BDNF a retina ganglionsejt rétegben (GCL) és a belső sejtes rétegben (INL) található békában (Duprey-Diaz és mtsai., 2002). Hasonló mintázat figyelhető meg a patkány (Perez és Caminos, 1995), a csirke (von Bartheld, 1998) a hal (Caminos és mtsai., 1999), az egér (Bennett és mtsai., 1999) és a galamb (Theiss és Güntürkün, 2001) esetében is. Békában a nervus opticus átvágása után a BDNF immunreaktivitása csökkent a ganglionsejtek rétegében, majd a regenerációt követően az intenzitás megközelítette a normál mértéket. A ganglionsejt réteggel szemben a tectum opticumban a BDNF festődés átmenetileg erősebb lett az axotómiát követően, ami arra utal, hogy az ép axonokban retrográd módon transzportáldó BDNF a sérülést követően felhalmozódik a tectális sejtekben. Ez a megemelkedett BDNF szint feltehetően szükséges az axonok benövéséhez, mivel a későbbiekben a BDNF szint csökken.

A **sejtfelszíni szignál molekulák** közül az ephrinek fontos szerepet játszanak a fejlődési folyamatokban, többek között az axon irányításában (Holder és Klein, 1999). Ezek az Eph családdhoz tartozó receptor tirozin kinázon keresztül fejtik ki hatásukat. A különböző ephrin

molekulák a tectum opticumban egy anteroposterior irányú grádiens alakítanak ki. Ez a molekuláris grádiens felelős azért, hogy a fejlődés és a regeneráció során a megfelelő retinotopicus lokalizáció kialakuljon a tectumban. Az ephrin-A2 overexpressziója csirkében (Nakamoto és mtsai., 1996) vagy az ephrin-A2 és -A5 eltávolítása egérben (Frisén és mtsai., 1998; Feldheim és mtsai., 2000) a temporalis retinafélből származó axonok eltévedését okozza.

Az utóbbi időben egyre több kísérletben vizsgálták az **ECM makromolekulák** szerepét a látóideg regenerációban. A **glikoproteinek** közül a **tenascin-R** megtalálható a felnőtt szalamandra nervus opticusában, de az ideg léziója után nyolc nap elteltével, amikor a retinalis ganglionsejtek (RGC) regenerációja elkezdődik nem mutatható ki tenascin-R expresszió a nervus opticusban (Becker és mtsai., 1999). Ezzel szemben egérben növekedés tapasztalható és ez a fokozott expresszió a lézió után még két hónapig magas marad (Becker és mtsai., 2000). A tenascin-C mennyisége csak kis mértékben nő az emlősökben nervus opticus sérülés után szemben az alacsonyabbrendű gerincesekkel, ahol jelentősebb növekedés figyelhető meg (Bartsch és mtsai., 1992a). A tenascin-R sérülés utáni eltérő expressziója emlősök és anamnióták központi idegrendszerében felelős lehet a központi idegrendszer eltérő regenerációs kapacitásáért.

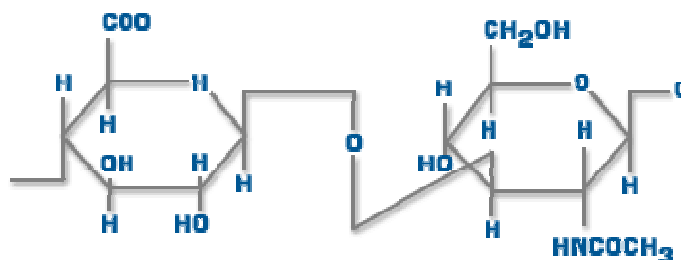
A **proteoglikánok** (PG) csoportjában mind a heparán-szulfát, mind a chondroitin-szulfát proteoglikánok (CSPG) szerepét vizsgálták a nervus opticus regenerációjában. A különböző heparán-szulfát (HS) oldalláncok eltérő módon hatnak az axon növekedésre *in vivo* (Walz és mtsai., 1997). A HS és a hozzá kötődő fibroblast növekedési factor (FGF) fontos szerepet játszik a retinális axonok növekedésében a tractus opticusban és a tectalis targetek elérésében. A HS-hoz kapcsolódó FGF kötődhet a béka látórendszerében található FGF receptorokhoz. A retinális ganglionsejtek (RGC) axonjai HS-ban gazdag környezetben növekednek a tractus opticusban, míg a tectum opticumban HS-ban szegény régióban haladnak tovább. Megfigyelték, hogy a HS és egyik receptorának az FGF-2-nek a mintázata megegyezik a *Xenopus laevis* látórendszerében: erős a festődés a diencephalonban a retinális axonok növekedésének útvonalában és nincs festődés a tectum opticumban (McFarlane és mtsai., 1995). Az axon megnyúlását gátolja a HS és az FGF-2 eltávolítása és az FGF receptorok blokkolása is. Az FGF-2 receptoron keresztül történő jelátviteli útvonal megszakítása a növekedő RGC axonoknál target felismerési defektushoz vezet és az axonok elkerülik a tectumot (McFarlane és mtsai., 1995, 1996).

A különböző központi idegrendszeri sérülések hatására a CSPG mennyisége nő, többek között a neurocané, versicané és a phosphacané (Pizzi és Elan, 2004). A chondroitin szulfát

proteoglikán immunreakció fokozódását mutatták ki a regenerálódó nervus opticusban aranyhalban (Battisti és mtsai., 1992) és a fejlődő csirke látórendszerében (McAdams és McLoon, 1995). *In vitro* kísérletekben igazolták, hogy a CSPG szintézis és transzport gátlása csökkenti az axonok kinövését a retinális explantumokban. A retinális axonok növekedését az exogén C4S (chondroitin-4-szulfát) indukálja, feltehetően az axon felszíni receptorain keresztül fejt ki a C4S a serkentő hatását (Challacombe és Elam, 1997).

2.3.2. Az ECM makromolekulái az idegrendszerben, feltételezett szerepük

2.3.2.1. Hyaluronsav



4. ábra. A hyaluronsav diszacharid alegységének szerkezete

A hyaluronsav (HA) egy nem szulfatált glükózaminoglikán (GAG), amely majdnem minden szövet extracellularis matrixában (ECM) megtalálható (Noble, 2002). Nincs proteoglikán (PG) oldallánca, de PG molekulák képesek kötni, pl.: aggrecan, versican, neurocan, brevican és nagy kiterjedésű makromolekula aggregátumot alkotnak. A HA ismétlődő szakaszokból épül fel, N-acetil glükózamin és glükuronsav diszacharid alegységekből áll (4. ábra). A HA a glükózaminoglikánok korai evolúciós formája. Az extracellularis matrix legnagyobb molekulája (MW: 2×10^5 - 10^7 Da), hossza elérheti a 25 μ m-t. A HA a polianionos karboxil csoportok következtében felcsavarodott, így a molekula nagy térfogat kitöltésére képes, emellett jelentős mennyiségű vizet és ionokat képes megkötni, fellazítva ez által a sejtek körüli ECM-t. A kémiai szerkezete jól ismert (Scott, 1998) és biológiai szerepéről is egyre több adat áll rendelkezésre (Laurent és Fraser, 1992; Laurent, 1998).

Funkcióját csak emlősökben vizsgálták részletesebben, az alacsonyabbrendű gerincesekben nem. A HA nagy mennyiségben fordul elő a fejlődő idegszövetben (Margolis

és mtsai., 1975; Toole, 1982), ahol a sejtproliferációra, transzformációra és a migrációra is hat (Holley, 1975; West és Kumar, 1989; Evanko és Wight, 1999; Morrison és mtsai., 2001). Részt vesz az intercelluláris kölcsönhatásokban és a jelátviteli folyamatokban (Laurent és Fraser, 1992; Sherman és mtsai., 1994; Cheung és mtsai., 1999).

A HA felnőtt emlős agyban is jelen van és fontos szerepet játszik a postnatalis élet során is (Margolis és mtsai., 1975; Delpech és mtsai., 1989; Yasuhara és mtsai., 1994). A HA-t megtalálták az axonok myelinhüvelyében (Egglis és mtsai., 1992; Gong és mtsai., 1994). Ideg regenerációban serkentő szerepét írták le a patkány környéki idegrendszerében (Seckel és mtsai., 1995; Wang és mtsai., 1998; Ozgenel, 2003), más szerzők gátló szerepét mutatták ki a sejt és a rost migráció során a központi idegrendszerben (Rhodes és Fawcett, 2004).

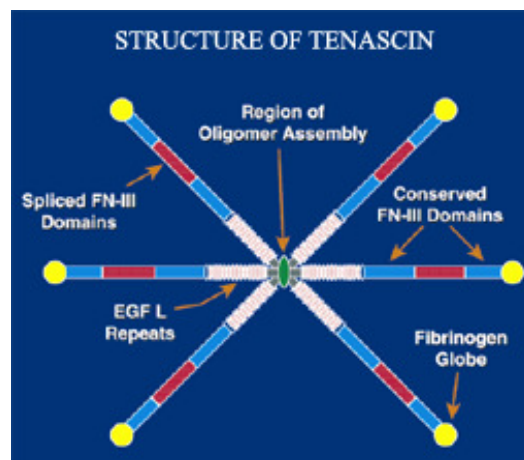
A HA szintézise a sejtmembránban folyik egy membránhoz kötött protein által, ez a hyaluronsav szintetáz (HAS). A gerincesekben három isoenzim (HAS1, HAS2, HAS3) mutattak ki, melyek mindegyike glikozil-transzferázként HA-t szintetizál, de eltérő enzimatisma tulajdonságokkal rendelkeznek a keletkező produktum mennyisége és lánc hosszúsága alapján (Weigel és mtsai., 1997). Mindhárom enzim cukoregységeket ad a nukleotid precursorokból a HA lánchoz a membrán cytoplasmatisma oldalán és a növekvő láncot a pericelluláris térbe továbbítja. A HA molekulák eredete a központi idegrendszerben még nem teljesen ismert. Egyes vizsgálatok csirke embrió gerincvelőben hyaluronsav-szintetáz 2 és 3 enzimét mutattak ki (Mészár és mtsai., 2005), az emberi agyban HAS 1 is megtalálható (Spicer és mtsai., 1997; Itano és mtsai., 1999). Vannak adatok, amelyek a HA neuronális eredetét írják le (Hartman és Maurer, 2001), mások szerint a hyaluronsavat glia sejtek termelik (Grumet és mtsai., 1985; Asher és Bignami 1991).

A HA lebontása receptor mediált endocytosisal és lizoszómális degradációval megy végbe. A HA-CD44 kapcsolat mediálja a HA endocitotikus eltávolítását a fejlődés kritikus szakaszaiban. Az endocitózis után a HA olyan lizoszómákba kerül, melyekben hyaluronidáz, β -glükuronidáz és β -N-acetilglükózaminidáz található (Roden és mtsai., 1989). A monoszacharidok a citoszolba kerülnek, ahol a glükuronsav lebomlik. Az N-acetilglükózamin foszforilálódik, majd deacetilálódik, a glükózamin-6-foszfátból deaminálás révén fruktóz-6-foszfát keletkezik, és ez bekerül a glikolízisbe.

A HA-kötő proteinek két csoportját különböztethetjük meg, a csoportosítás a funkcionális szerep és a kapcsolat tulajdonságai alapján történik. Az első csoportba tartozók, a HA-kötő strukturális molekulával rendelkező fehérjék, pl. hyaluronectin, aggrecan és versican, melyek a hyaluronsav egy decaszacharid egységét ismerik fel (Yamagata és mtsai., 1986). Ebbe a csoportba tartoznak még a heparán-szulfát PG-ok, melyek fontos szerepet játszanak az

idegsejtek és Schwann sejtek közötti kapcsolatok modulálásában. A HA-kötő molekulákhoz tartozik a GHAP (glial HA-binding protein), amely a versican N-terminális HA-kötő doménjének felel meg. A másik csoportba a sejtfelszínhez kapcsolt HA receptorok tartoznak, melyeket hyaladherineknak neveznek, ezek egy HA hexasaccharidot ismernek fel (Laurent és mtsai., 1986). Ide tartoznak a p125 focal adhesion kinase (FAK), a p42/44 extracellular regulated kinase (ERK), a TSG-6, a brevican, a neurocan, a versican és a CD44, melyek közül a CD44 membránhoz kötött és link modult tartalmaz. A HA-CD44 kölcsönhatás fontos szerepet játszik az intracelluláris jelátviteli folyamatokban, a fejlődésben, a gyulladásos folyamatoknál és a T sejtek homingjában (Aruffo és mtsai., 1990; Fitzgerald és mtsai., 2000; Lesley és mtsai., 1993, 2000; Sherman és mtsai., 1994). A lymphocita CD44H isoformának középső doménje speciális kölcsönhatásba lép a magas endothelű venulák (HEV-high endothelial venula) endothel sejtjei által bemutatott mucosal adressin-nel. A RHAMM (receptor for hyaluronan-mediated motility) HA kötésében egy 9 aminosavból álló szekvencia játszik fontos szerepet. A RHAMM elsősorban a sejtmigrációban, sejtszétválásban és a sejtttranszformációban játszik fontos szerepet (Entwistle és mtsai., 1996). A RHAMM-ot több idegsejt típusban és oligodendrocytában kimutatták, a patkány központi idegrendszerében heterogén eloszlást mutat. Ezek alapján feltételezhető, hogy a RHAMM és fő ligandja a HA fontos szerepet játszhat a központi idegrendszeri sejt jelátvitelben és a citoszkeletális regulációban.

2.3.2.2. Tenascin



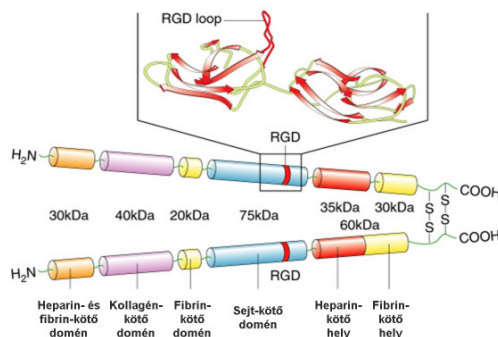
5. ábra. A tenascin szerkezete

A központi idegrendszerben a tenascin-C az –R és –Y isoformák jelen vannak. A tenascin-C egy glycoprotein, a tenascin család egyik tagja. Két trimerből épül fel, melyeket diszulfid híd kapcsol össze az N terminálison keresztül és így hexamert hoz létre (5. ábra). Tömege elérheti az 1,9 millió daltont. A monomer egy diszulfid hídból, 14 EGF (homológ az epidermális növekedési faktorról-epidermal growth factor) doménből, legalább 8 fibronectin-szerű (FN-III) doménből és egy fibrinogen doménből épül fel. A 8 FN-III doménhez még további, maximum 9 FN-III domén kapcsolódhat, ezek száma alapján splice-variánsokat különíthetünk el. A fibronectinnel és a chondroitin-szulfáttal kölcsönhatásba léphet, a chondroitin-szulfáton keresztül hyaluronsavat is köthet.

A tenascin különböző formái az idegrendszer fejlődése során, annak különböző fázisaiban expresszálódnak és a fejlődés befejezése után szintjük csökken (Faissner, 1997). A tenascin-C termelésében az éretlen és reaktív astrocyta, a radialis glia, az éretlen neuronok és a fejlődő retina sejtei vesznek részt (Philips és mtsai., 1995; Dörries és mtsai., 1996; Gotz és mtsai., 1996; Meiners és Geller, 1997).

A tenascin fontos szerepet játszik a sejt migráció és a differenciáció szabályozásában, így a crista neuralis sejtek vándorlásában, kétéltűekben (Epperlein és mtsai., 1988; Mackie és mtsai., 1988; Riou és mtsai., 1988) és csirkében (Crossin és mtsai., 1986; Bronner-Fraser, 1988). A fejlődő idegrendszerben a tenascin-C a neurocanhoz és a phosphacanhoz kötődik (Grumet és mtsai., 1994). A tenascin expressziója emelkedik emlősökben a központi és a környéki idegrendszeri sérüléskor (Martini és mtsai., 1990; McKeon és mtsai., 1991; Laywell és mtsai., 1992). Kimutatták, hogy kisagy- és nagyagykéreg sérülésénél (McKeon és mtsai., 1991; Laywell és mtsai., 1992) valamint a gerincvelői és a dorsalis gyökér sérülésénél fokozódik az astrocyták tenascin termelése. Normál eger látóideg körüli leptomeningeális sejtei nem termelnek tenascint, viszont abban az esetben, ha látóidegét átvágták, a sérülést követő 18-25. napig expresszálták a tenascint (Bartsch és mtsai., 1992a). Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a transforming growth faktor β (TGF β) és az interleukin-1 (IL-1) fokozhatja a tenascin expresszióját *in vitro* (Pearson és mtsai., 1988; McGachren és Lightner, 1992). A tenascin-C splice-variánsai eltérő módon befolyásolják az ideg regenerációt (Chung és mtsai., 1996; Meiners és Geller, 1997; Gotz és mtsai., 1997). Az egyik variáns (Fn A-D) segíti a neurit kinövését a sejttestből (Meiners és Geller, 1997; Meiners és mtsai., 2001). A tenascin-C magasabbrendű gerincesekben csak a fejlődő és a sérült központi idegrendszerben van jelen jelentős mennyiségben, szemben a kétéltűekkel, ahol felnőtt korban sem csökken a mennyisége jelentős mértékben (Bartsch és mtsai., 1992a; Laywell és mtsai., 1992; Ajemian és mtsai., 1994; Becker és mtsai., 1995; Theodosius és mtsai., 1997; Joester és Faissner, 2001).

2.3.2.3. Fibronektin



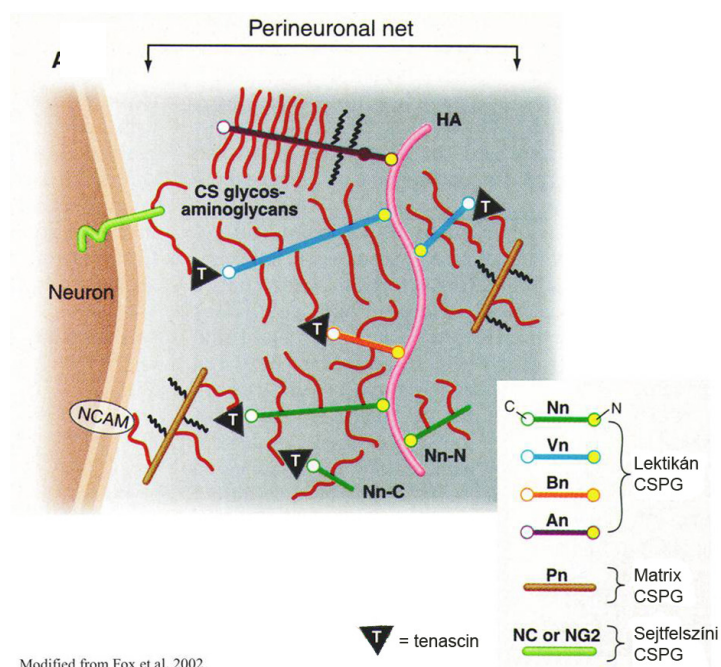
6. ábra. A fibronektin molekula vázlatos szerkezete

A fibronektin egy nagyméretű glycoprotein, ami megtalálható a kötőszövetben, a sejt felszínén és a vérplazmában. A fibronektin dimer, két monomerje között diszulfid hidak találhatók (6. ábra). Az N-terminálistól a C-terminális felé haladva 6 FN-I domén, 2 FN-II domén, 3 FN-I és 15 FN-III domén található. A plazmában a plazma fibronektin (pFn), míg a szövetek extracellularis matrixában a cellularis fibronectin (cFn) található. Annak ellenére, hogy mindkét fibronektint (pFn és cFn) ugyanaz a gén kódolja, az isoformáik különböző splice-variánsok (Schwartzbauer, 1991). Míg a cFn-t a különböző szövetek sejtjei termelik, addig a pFn csak a májban expresszálódik (Owens és Climino, 1982). A fibronektin a citoszkeleton és az ECM számos makromolekulájával, a neuronok, fibroblastok és fagociták sejt felszíni receptoraival léphet kölcsönhatásba. A fibronektint radier gliasejtek termelik (Sheppard és mtsai., 1995; Stettler és Galileo, 2004).

A fibronektin jelen van a fejlődő központi idegrendszerben, ahol axon növekedés tapasztalható (Pearlman és Sheppard, 1996) és segíti a neuronális adhéziót és a neurit kinövését *in vivo* (Lander, 1987). Környéki idegrendszeri sérüléseknél a fibronektin „csatornaként” működik a regenerálódó ideg számára (Whitworth és mtsai., 1995).

A fibronektin fontos szerepet játszik a sejtmigrációban az embriogenezis során, ezen belül is gasztruláció során hat a mezoderma sejtek migrációjára, a pericardium sejtek migrációjára és a végtagok kialakulására (Downie és Newman, 1995).

2.3.3. A perineuronális háló (perineuronal net, PN)



7. ábra. A perineuronális háló szerkezete, neuronal cell adhesion molecule (NCAM), chondroitin-szulfát proteoglikán (CSPG), neurocan (Nn), versican (Vn), brevican (Bn), aggrecan (An) (Fox és Caterson, 2002).

Az ECM specializált, csak az idegrendszerben megtalálható formája a perineuronális háló (7. ábra), ami a neuron sejttestje, a proximális dendritok és az axonok kezdeti szakasza körül található meg, amit először Golgi írt le 1893-ban. A perineuronális hálóban chondroitin-szulfát PG-ok, a versican, a phosphacan és a neurocan és glycoproteinek találhatók. A PN felépítésében a HA és a HA-kötő PG-ok, glycoproteinek mellett a sejtfelszíni HA receptorok is részt vesznek (Knudson és Knudson, 1993), a különböző idegsejtek körül eltérő összetételű PN található (Lander és mtsai., 1997). A perineuronális háló postnatalisan jelenik meg a szinapszisok kialakulásának és a myelinizációnak időszakában, fontos szerepet játszik a sejtmigrációban, növekedésben és a neurális mintázat kialakításában (Faissner és Schachner, 1995; Faissner és Steindler, 1995; Margolis és Margolis, 1997) (6. ábra). Mind az idegsejtek, mind az őket körülvevő glia sejtek részt vesznek a PN termelésében (Celio és Blumcke, 1994). A felnőtt állatokban a szinaptikus kapcsolatok stabilizálásában, a sejtek közötti kapcsolatok fenntartásában és módosításában játszik fontos szerepet (Hockfield és McKay, 1983; Celio és mtsai., 1998).

2.3.4. Az átmeneti zóna

Az extracellularis matrix másik speciális előfordulási helye a központi idegrendszerben az átmeneti zóna (transitional zone-TZ), ahol a környéki idegrendszerhez tartozó ideg belép a központi idegrendszerbe. A központi idegrendszert az astrocyták által alkotott glia limitans borítja. A perifériás ideg belépésénél a glia limitans megvastagodik és ezen a területen, mind a perifériás, mind a központi idegrendszerre jellemző myelin borítás megtalálható, ezért ezt a területet átmeneti zónának nevezzük. Az átmeneti zónán csak az idegrost hatol át. A glia limitanst kívülről borító lamina basalis ezen a részen a Schwann sejteket beborító lamina basalisban folytatódik, így a membrana basalisban nincs megszakítás (Frahner, 1999).

Az átmeneti zónában a fejlődés során átlépnek a perifériás idegek a glia limitanson. Később, felnőtt állat esetében az átmeneti zóna a szenzoros axonok számára barrierként jelenik meg, a regeneráció elmaradásának oka a non-permisszív környezetben keresendő. E környezet kialakításában főleg ECM molekulák, astrocyták és más gliasejtek által termelt faktorok vesznek részt (Steinmetz és mtsai., 2005). Szenzoros idegek sérülése után reaktív gliózis figyelhető meg, az astrocyták aktiválódnak. A reaktív astrocyták brevicant és versican, míg az oligodendrocyták a versican V1 és V2 isoformáit termelik (Beggah és mtsai., 2005). Ezek a molekulák nagy mennyiségben megtalálhatóak a TZ-ban és dorsalis gyökér axotómia után szintjük emelkedik egerekben (Beggah és mtsai., 2005).

5. CÉLKITŰZÉSEK

Annak eldöntésére, hogy az ECM makromolekulái permisszív vagy non-permisszív szerepet játszanak-e az idegi regenerációban, szükség van az egyes molekulák normál eloszlási mintázatának ismeretére az idegrendszer különböző struktúráiban. Az adatok birtokában lehetővé válik az idegi lézió és regeneráció során az ECM expressziós mintázatában bekövetkezett változás követése.

A fentieknek megfelelően az alábbi célokat fogalmaztuk meg:

1. A hyaluronsav, tenascin C és fibronectin megoszlási mintázatának vizsgálata a béka idegrendszerében.
2. A hyaluronsav és a tenascin C megoszlásának kvantitatív vizsgálata a nervus opticus végződési területein békában.
3. A hyaluronsav és a tenascin C kvalitatív és kvantitatív változása a nervus opticus regenerációja során békában.

Ilyen vizsgálati eredményeket nem találtunk a szakirodalomban.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

Vizsgálatainkban felnőtt kecskebékát használtunk (*Rana esculenta*), kísérleteinket a DEMÁB (Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság) engedélyével végeztük (Eng. Sz.:22/2001.). A hyaluronsav, a tenascin és a fibronectin kimutatását három állatból származó metszeteken végeztük, a regenerációs kísérletekben használt állatok számát a 4.5. fejezetben ismertetjük. Az állatokat 0,1 %-os MS-222 (3-aminobenzoészav etil észter, Sigma, St. Louis, MO) felhasználásával elaltattuk és transcardialisan izotóniás sóoldattal perfundáltuk 2-3 percig. A teljes központi idegrendszert izoláltuk és a telencephalont, a diencephalont, az agytörzset a hozzájuk kapcsolódó agyidegekkel, a gerincvelőt a mellső és a hátsó gyökérrel külön-külön Sainte-Marie fixálóba (99 % abszolút etanol, 1 % koncentrált ecetsav) helyeztük egy éjszakára (Sainte-Marie, 1962; Tuckett és mtsai., 1988). A blokkokat paraffinba ágyaztuk be és Reichert microtommal 10 µm vastagságú metszeteket készítettünk.

4.1. A hyaluronsav kimutatása

A deparaffinálás után a metszeteket hidrogén-peroxid 2%-os FP (foszfát puffer, pH 7,4) oldatával 30 percig, majd 1%-os BSA tartalmú 0,1 M-os FPS oldattal 30 percig kezeltük. A hyaluronsav specifikus kimutatására biotinilált HA kötő próbát (bHABP) használtunk 1:10 végleges hígításban (5 µg/ml koncentrációban) 4 °C-on egy éjszakára (a próba rendelkezésünkre bocsátásáért külön köszönettel tartozunk Raija Tammi és Markku Tammi professzoroknak, Dept. Anat. Univ. Kuopio, Kuopio, Finland, részletesen: Tammi és mtsai., 1989). A HA próba az aggrecan biotinilált G1 doménjét tartalmazza, a G1 domain hyaluronsav-kötő régióval rendelkezik. Az aggrecan borjú ízületi porcából származik (Tammi és mtsai., 1989). A metszeteket avidin-biotin peroxidáz komplexszel (Vector, Burlingame, CA) 1 órát inkubáltuk, a reakciót hidrogén-peroxiddal és 3,3'-diaminobenzidinnel (DAB) vizualizáltuk.

A reakció specificitását két módon ellenőriztük. Az egyik csoportban, a metszeteket a bHABP nélkül inkubáltuk. A másik csoportban, a próba előtt 4 mg/ml koncentrációjú *Streptomyces* hyaluronidázzal (Calbiochem, San Diego, CA) kezeltük a metszeteket egy éjszakára. A pozitív kontrol esetében a reakció azonos az idegrendszerrel leírtakkal, csak a metszetek a béka sternumából származó HA-ban gazdag hyalinporcból készültek.

4.2. A tenascin-C kimutatása

A tenascin-C kimutatásához a hyaluronsavhoz hasonlóan először deparaffináltuk és rehidráltuk a metszeteket. Az immunreakcióhoz egérben termeltetett monoklonális antitestet (Sigma) használtunk, majd rehidráció után a metszeteket 0,1 M-os PBS-sel mostuk, 1:4000-es hígítású primer antitesttel jelöltük és egy éjszakán át inkubáltuk szobahőmérsékleten. A negatív kontrollt csak PBS-sel kezeltük. Pozitív kontrollként béka vesemetszetet használtunk. Másnap a metszeteket 0,1 M-os PBS-sel mostuk, ezután 1:500 hígítású biotinált anti-mouse szekunder antitestet helyeztünk rá egy órára. Ezután újra 0,1 M-os PBS-sel mostuk, majd avidin-biotin peroxidáz komplexszel inkubáltuk egy órán keresztül. A metszeteket 0,1 M-os PBS-sel, ezután FP-rel és végül 0,05 M-os pH 7,4 Tris pufferrel mostuk. Az immunhisztokémiai reakciót DAB kromogénnel vizualizáltuk. A metszeteket FP-rel mostuk, majd dehidráltuk és lefedtük.

4.3. A fibronectin kimutatása

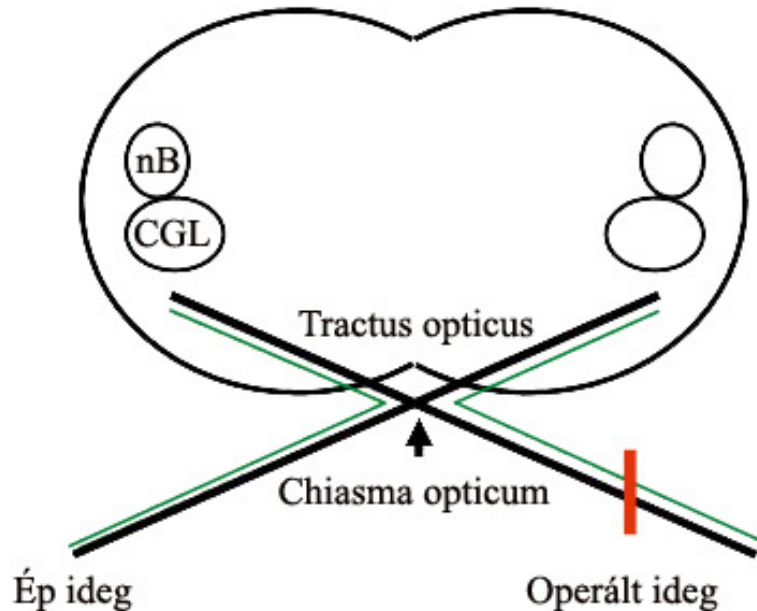
A fibronectin kimutatásához a hyaluronsavhoz hasonlóan először deparaffináltuk és rehidráltuk a metszeteket. Rehidráció után 20%-os normál ló szérummal egy éjszakára 4 °C-on blokkoltuk. Az immunreakcióhoz egérben termeltetett monoklonális antitestet (Sigma) használtunk. A blokkolás után a metszeteket 0,1 M-os PBS-sel mostuk és 1:400 hígítású primer antitesttel egy éjszakán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. A negatív kontrollt csak PBS-sel kezeltük. Pozitív kontrollként béka vese és bőr metszetet használtunk. Másnap 0,1 M-os PBS-sel mostuk, ezután 1:500 hígítású biotinált anti-mouse szekunder antitestet helyeztünk rá egy órára. Ezután újra 0,1 M-os PBS-sel mostuk, majd avidin-biotin peroxidáz komplexszel inkubáltuk egy órán keresztül. A metszeteket 0,1 M-os PBS-sel, ezután FP-rel és végül 0,05 M-os pH 7,4 Tris pufferrel mostuk. Az immunhisztokémiai reakciót DAB kromogénnel vizualizáltuk, FP-sel történt mosás után a metszeteket dehidráltuk és lefedtük.

4.4. Szemikvantitatív és kvantitatív analízis

Először camera lucida segítségével a megfelelő keresztmetszetekbe berajzoltuk a béka agyának és gerincvelőjének pozitív HA, tenascin-C és fibronectin reakciót adó területeit. Ez alapján sematikus rajzokon öt intenzitási fokozattal ábrázoltuk a reakciók eloszlási mintázatát. A központi idegrendszer terminológiáját ten Donkelaar (1998) munkája alapján használtuk.

A kvantitatív analízishez a felvételeket Nikon Eclipse 800 mikroszkóppal Spot RT digitális kamerával készítettük. A nervus opticusban és végződési területein megmértük a hyaluronsav és a tenascin-C reakció optikai denzitását a következő módon. Minden metszetről két véletlenszerűen kiválasztott kép készült. Minden képen 20 mérést végeztünk. A vizsgált terület (ROI=area of the region of interest) minden mérésnél $400\ \mu\text{m}^2$ volt, a területre vonatkoztatott optikai denzitás értékeket (AIOD=area integrated mean optical density values) minden vizsgált területre kiszámoltuk és ezeket az adatokat felhasználtuk az eredmények bemutatásához. Minden csoportban kiszámoltuk az optikai denzitás szórását (standard deviánsát- SD).

4.5. Nervus opticus regenerációs vizsgálatok



8. ábra. A diencephalon sémás rajza. A piros vonal mutatja a nervus opticus átvágásának helyét.

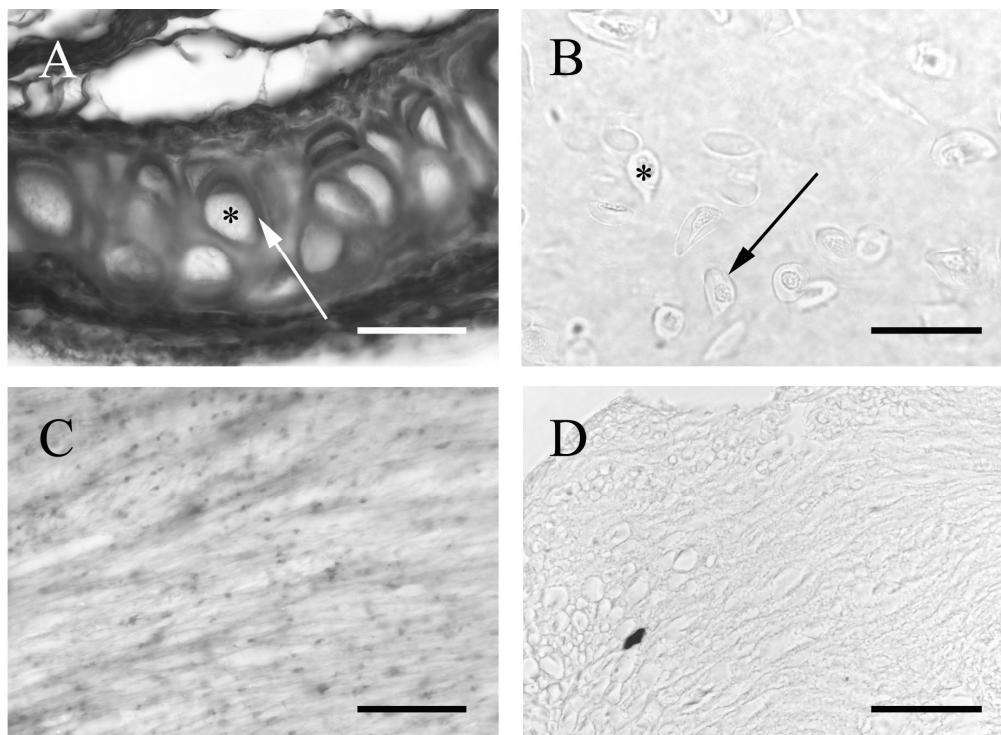
A békákat a fentiekben leírt módon elaltattuk és a szájnyálkahártyát felnyitottuk. A nervus opticus takaró szemmozgató izmok lepreparálását követően a nervus opticus a szemhez közeli részen átvágtuk (8. ábra). A műtét után a nyálkahártyát szövetragasztóval összeragasztottuk. A 42 béka a műtét után 3, 5 napig, illetve 1., 2., 3., 4., 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 és 12 hétig túlélte. A túlélési idő letelte után a békákat újra elaltattuk és transcardialisan izotóniás sóoldattal perfundáltuk 2-3 percig. A blokkokat paraffinba ágyaztuk és Reichert

microtommal 10 μm vastagságú metszeteket készítettünk. A metszeteken HA próbát és tenascin-C immunreakciót végeztük el. Felvételeket készítettünk a Nikon Eclipse 800 mikroszkóppal SPOT RT digitális kamerával. A nervus opticus végződési területein a kvantitatív analízisnél leírt módon megmértük a HA és a tenascin-C reakció optikai denzitását a különböző túlélési stádiumokban.

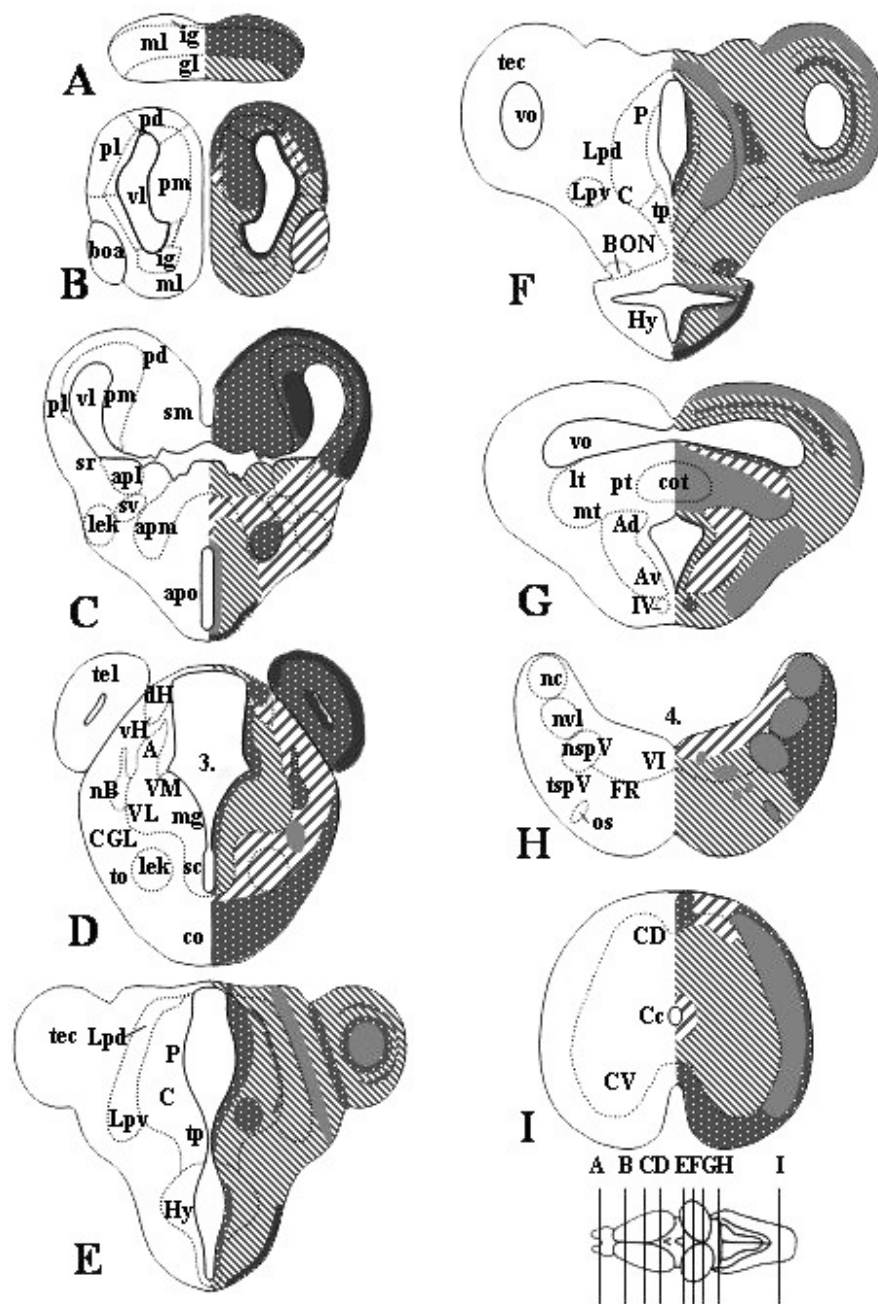
5. EREDMÉNYEK

5.1. A béka központi idegrendszerének hyaluronsav térképe

A hyaluronsav reakciónál pozitív kontrollként béka sternum porcot és látóideget használtunk. A kontroll sternum porcban intenzív HA reakció volt látható a territorialis és az interterritorialis matrixban (9. A ábra), a nervus opticusban pedig a rostok körül (9. C ábra). Ha a sternum porcot (9. B ábra) vagy a látóideget (9. D ábra) bHABP nélkül inkubáltuk vagy bHABP-val inkubáltuk, de *Streptomyces* hyaluronidáz kezelés után, nem volt tapasztalható reakció.



9. ábra. HA reakció pozitív kontroll (A, C) és negatív (bHABP nélkül inkubált) kontroll (B, D) sternum porcban (A, B) és nervus opticusban (C, D). (A) Intenzív a HA reakció a territorialis és az interterritorialis matrixban a chondrocyták körül (nyíl), a citoplazma negatív (csillag). A negatív kontroll matrixa és citoplazmája (csillag) nem festődött (B). Pozitív HA reakció a nervus opticus rostjai körül (C). A negatív kontrollban nem található festődés (D). Lépték = 50 μ m.



10. ábra. A HA reakció eloszlási mintázata a béka agy és gerincvelő keresztmetszeteiben, a jobb oldali legalsó rajz jelöli a metszetek helyét. Minden rajz baloldalán, a struktúrák, jobboldalán a HA festődés mintázata látható. A-D: telencephalon, D-F: diencephalon, G: mesencephalon, H: rhombencephalon és I: gerincvelő. A festődési mintázatot öt intenzitási fokozattal ábrázoltuk.

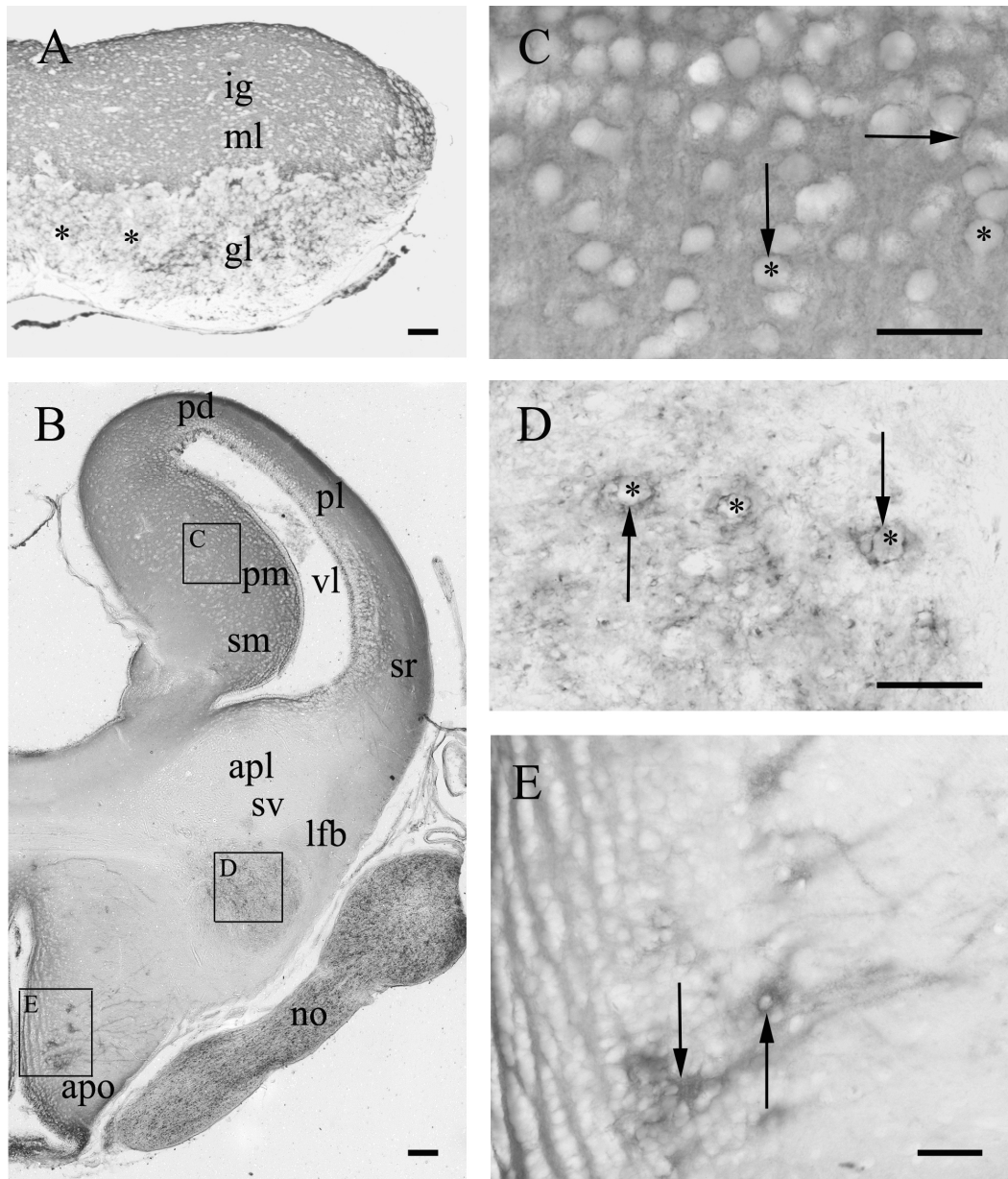
Nagyon gyenge: Gyenge: Közepes: Erős: Nagyon erős:

(Az ábrán látható rövidítéseket lásd a rövidítés jegyzékben.)

A béka központi idegrendszerében a HA reakciót a fehér- és a szürkeállomány különböző területein figyeltük meg a telencephalontól a gerincvelőig (10. ábra). A fehérállományban az axonok körül volt látható reakció. A szürkeállományban a HA reakció kétféle, homogén vagy granuláris megjelenést mutatott. A neuropilben számos területen a perikaryont, a dendriteket és az axon kezdeti szakaszát egy vékony erősen festődő sáv vette körül, ez a perineuronális háló (PN) (7. ábra). Nagyobb nagyítással a PN inhomogén, ami abból adódott, hogy pozitívan festődő területek, festetlen területekkel alternáltak.

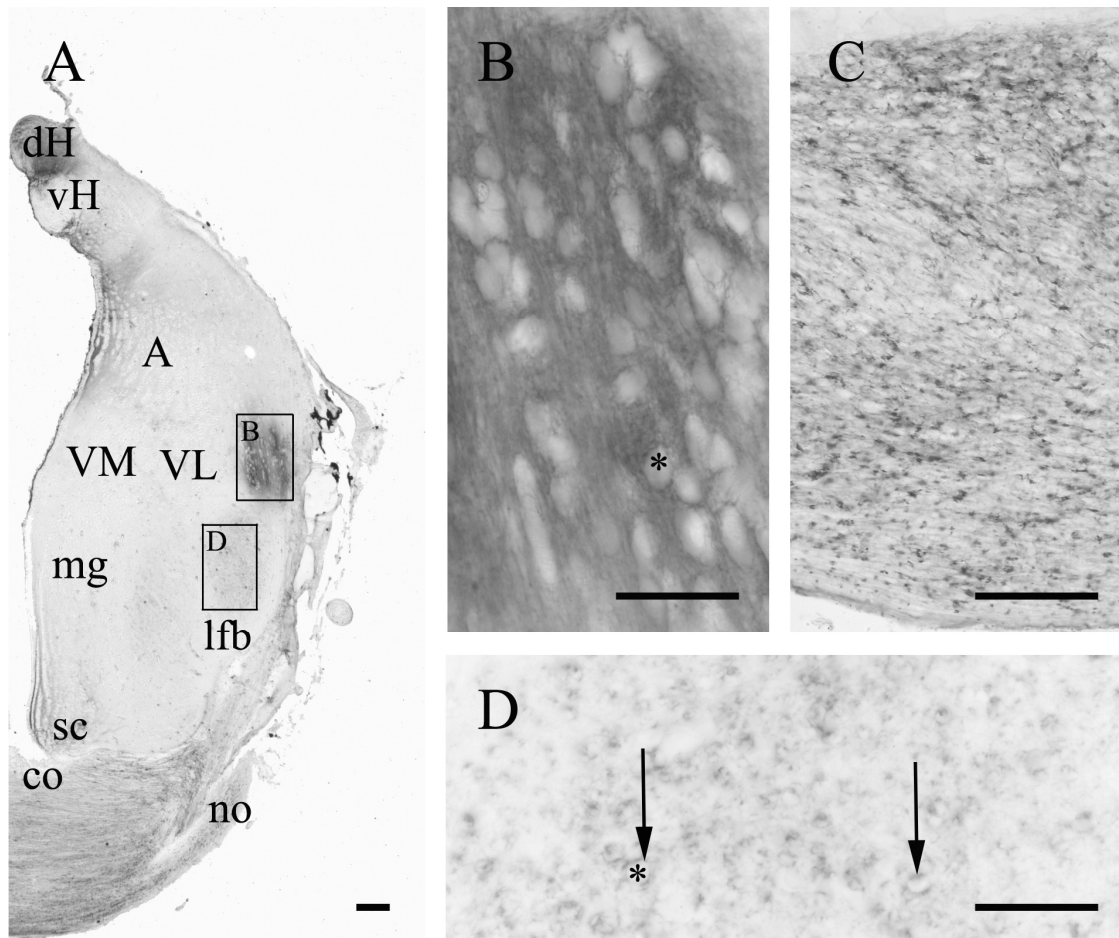
Telencephalon A hyaluronsav eloszlása regionális eltéréseket mutatott a telencephalon különböző struktúráiban (10. A-D ábra, 11. A-B ábra). A bulbus olfactoriusban a legerősebb reakciót a stratum granulosum internum és a stratum mitrale mutatta (10. A ábra, 11. A ábra). Nagyobb nagyítással látható volt, hogy a HA reakció homogén a stratum granulosum internumban és a mitralis sejtek rétegében a sejtek körül, a PN nem volt felismerhető. A stratum glomerulare kevésbé intenzíven festődött és foltszerű mintázatot mutatott, a festetlen kör alakú területek feltehetően a szagló glomerulusok lehettek, pozitív HA gyűrűvel (11. A ábra). A bulbus olfactorius accessorius gyengén festődött.

A palliumban erős HA reakció volt látható, de az intenzitás erőssége regionális különbségeket mutatott (10. B, C ábra, 11. B ábra). A pallium dorsaleban és lateraleban a reakció a felszíni zónában a legerősebb és a ventriculus lateralis ependymája felé haladva fokozatosan csökkent. A legerősebben a pallium mediale festődött. Intenzív HA reakció volt látható nagyobb nagyítással a perikaryonok körül, de az erősen festődő neuropiltól nehéz volt elkülöníteni (11. C ábra). A nucleus septalis medialisban és a striatum rostraleban a HA reakció intenzitása caudalis irányban csökkent. A subpallialis szürkeállomány világosan festődött, kivéve az amygdala pars medialisát, ahol különösen intenzív HA reakció volt látható a perikaryonok körül (11. D ábra). A lateralis előagyi kötegben gyenge HA reakciót tapasztaltunk. Az area preoptica intenzív HA reakciót mutatott a nagysejtes régióban a sejttestek és a proximalis dendritek körül, a perineuronális hálóban (11. E ábra).



11. ábra. HA reakció a telencephalonban. Bulbus olfactorius keresztmetszet (A). A HA reakció intenzívebb a stratum granulosum internumban (ig) és a stratum mitraleban (ml), mint a stratum glomerulareban (gl). A gromerulusok (csillagok) körül HA pozitív terület látható. Telencephalon keresztmetszet (B). A bekeretezett területek nagyobb nagyítással láthatóak a C-E ábrán. Intenzív HA reakció látható a perineuronális hálóban (nyilak) a perikaryon körül (csillagok) a pallium medialeban (pm) (C), az amygdala pars medialisban (apm) (D) az area preopticanban (apo) (E). Lépték: A-B = 200 μ m és C-E = 50 μ m.

Diencephalon A telencephalonhoz hasonlóan a HA reakció eloszlása és intenzitása regionális eltéréseket mutatott (10. D-F ábra, 12. A ábra). A diencephalon periventricularis részén HA pozitív és negatív sávok váltakoztak, ami a HA felhalmozódását jelezhetette a neuronok sorai között (12. A ábra).



12. ábra. HA reakció a diencephalonban. Diencephalon keresztmetszet (A). A bekeretezett területek nagyobb nagyítással láthatók a B és D ábrán. A nucleus Bellonciban (nB), intenzíven festődött a neuropil, de a PN nehezen elkülöníthető (B). A perikaryont csillag jelöli. A nervus opticusban inhomogén a reakció (C). A corpus geniculatum lateraleban (CGL) a HA pozitív PN (nyíl) könnyen felismerhető a perikaryon (csillag) körül (D). Lépték: A = 200 μ m, B-D = 50 μ m.

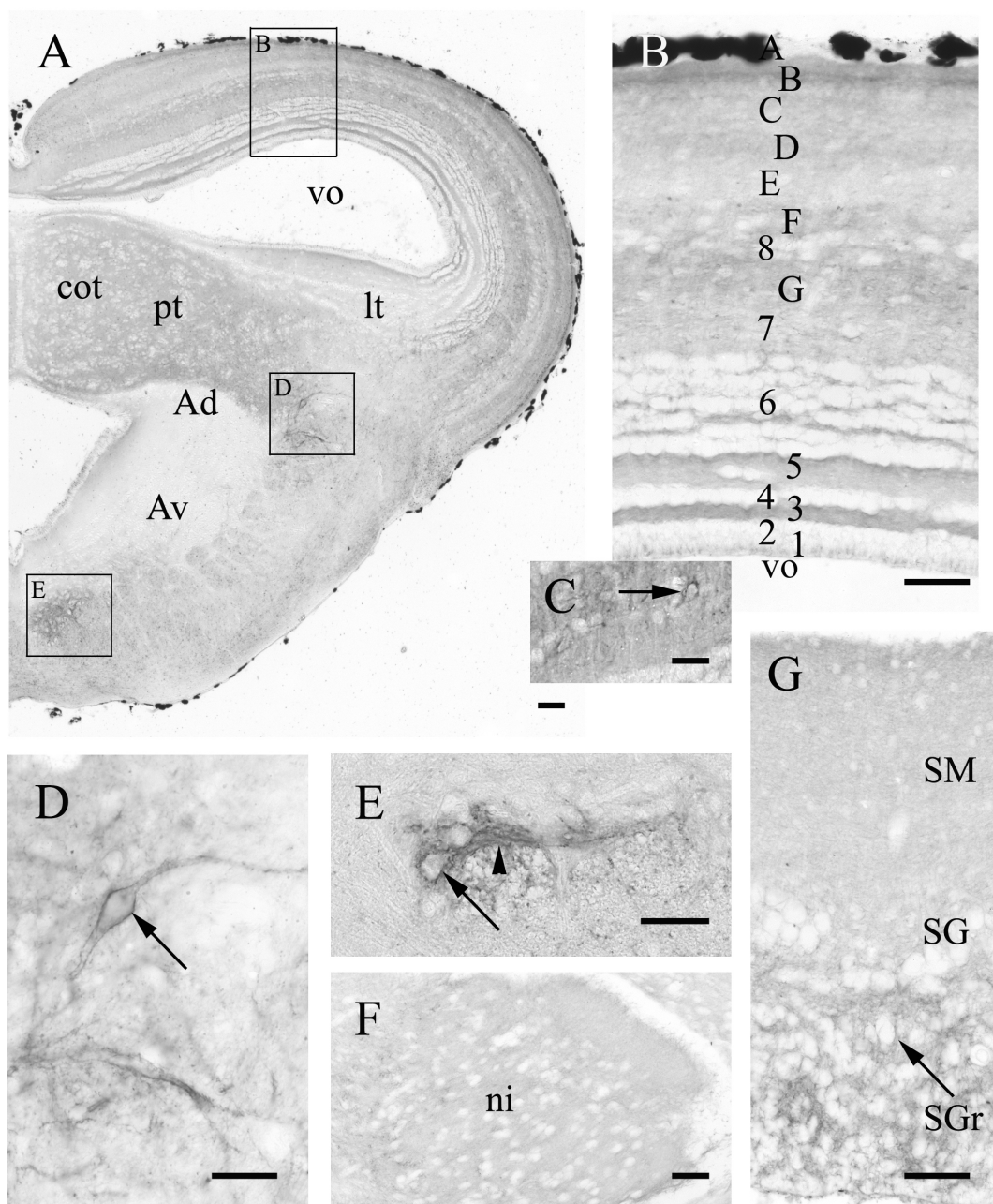
A habenula dorsalis nagyon intenzív reakciót mutatott, míg a habenula ventralis alig festődött (10. D ábra, 12. A ábra). A thalamusban a HA pozitivitás caudalis irányban nőtt, a legerősebb reakciót a nucleus lateralis thalami pars posterodorsalis, a nucleus centralis thalami és a nucleus Bellonci mutatta (10. D ábra, 12. B ábra). A thalamus más részei, többek között a

corpus geniculatum laterale gyengébb HA reakciót mutatott (10. D-F ábra, 12. D ábra). A nucleus Bellonci (nB) erősen festődő neuropiljében nehezen volt elkülöníthető a perineuronális háló, ezzel szemben jól látható volt a corpus geniculatum lateraleban (CGL) (12. B, D ábra). A hypothalamus subependymalis és subpialis régiójában erős pozitivitás volt látható (10. E ábra, 12. A ábra). Erős HA reakció volt látható a nervus opticusban, chiasma opticumban és a nervus opticusban. A nervus opticusban tapasztalt inhomogén reakcióért a HA-nak az axonok és oligodendroglia sejtek körüli jelenléte lehetett felelős (12. C ábra).

Mesencephalon A tectum opticumban, a B, D, F, 5. és 3. rétegben intenzív HA reakció volt látható, a reakció intenzitása gyengébb a G, C, E, 8., 7. és 6. rétegekben, míg nagyon gyenge a reakció az A, 4., 2. és 1. rétegekben (10. F, G ábra, 13. A-B ábra). Az F és 8. rétegben jól felismerhető volt az intenzíven festődő perineuronális háló (13. B-C ábra). A 6.-os rétegnek a felváltva megjelenő HA pozitív és negatív rétegek sávozott megjelenést adtak. A tegmentum mesencephaliban a szürkeállomány erősen festődött a torus semicircularis subependymalis, principalis, magnocellularis, laminaris és commissuralis magjaiban és hasonlóan intenzív reakció volt látható a nucleus nervus oculomotorii és nucleus nervus trochlearis területén (10. G ábra, 13. A, D, E ábra). Ezzel szemben a nuclei anterodorsalis és anteroventralis tegmenti gyengén festődött (10. G ábra, 13. A ábra). A tegmentum fehérállományában a HA reakció intenzitása regionális eloszlást mutatott, a legerősebb reakció a subpialis zónában volt látható. Erős HA reakció volt látható a nucleus opticus basalisban (BON) (10. F ábra). A nucleus isthmiben a széli rész és a belső régió neuropilje sötétén festődött (13. F ábra).

Cerebellum A kisagy minden rétegében detektáltuk a HA reakciót, a legerősebben a stratum granulosum festődött, ahol HA reakció kör alakú negatív területeket vettek körbe, amelyek feltehetőleg a kisagyi glomerulusoknak feleltek meg (13. G ábra).

Rhombencephalon A HA reakció intenzitása jelentős különbségeket mutatott a szürkeállomány különböző területein (10. H ábra, 14. A, C, F ábra). Minden agyidegi mag erős reakciót mutatott, a legerősebb volt a motoneuronok körüli perineuronális háló területe (14. B ábra). Az érző agyidegek magjai, mint a nucleus cochlearis és a nucleus vestibularis lateralis (Deiters mag) sejtjei körül is pozitív HA reakció volt megfigyelhető, különösen erős a Deiters mag neuronjai körül (14. E ábra).



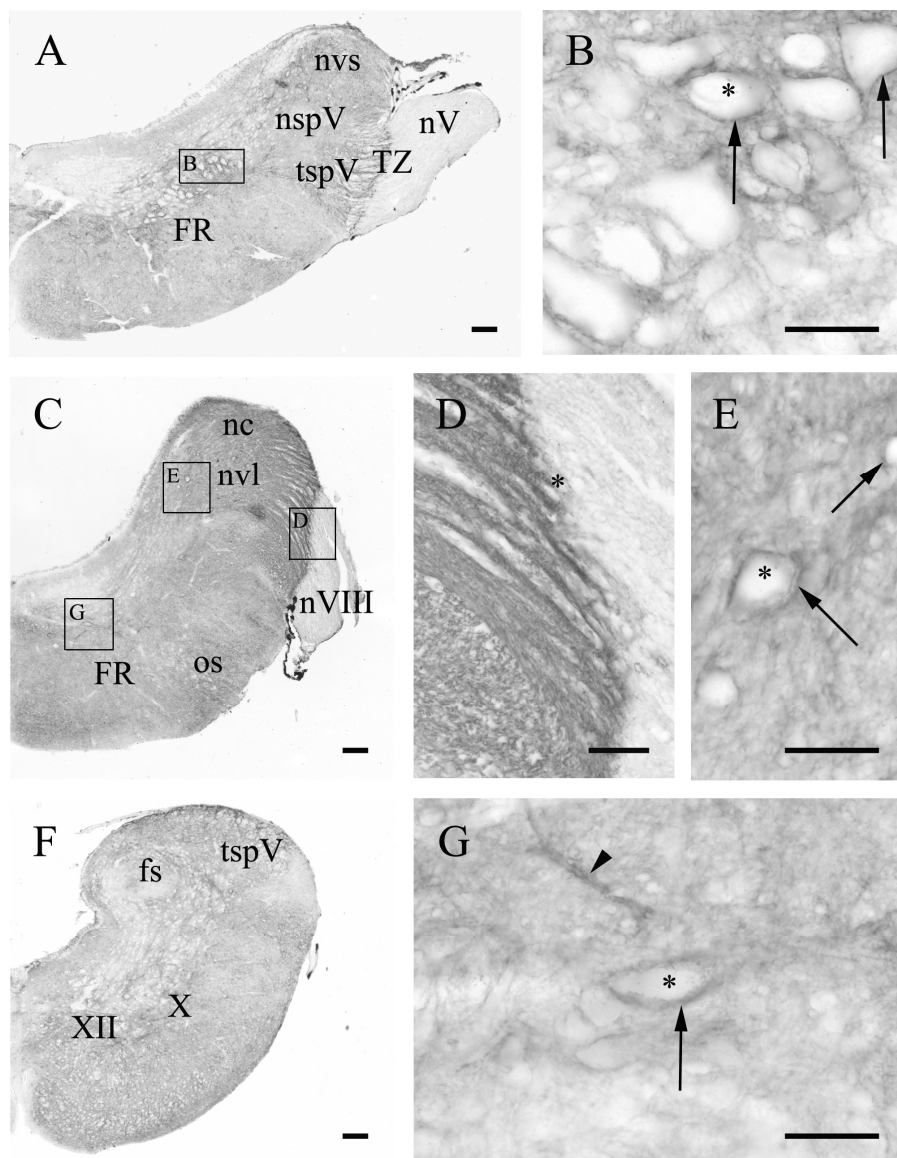
13. tábla. HA eloszlási mintázat a mesencephalonban. Mesencephalon keresztmetszet (A). A bekeretezett területek a B, D és E ábrákon láthatók nagyobb nagyítással. A tectum opticumban a legerősebb a festődés a B, D, F, 5. és 3. rétegekben (B). A PN felismerhető a 8. és F rétegekben. HA pozitív a PN egy neuron körül (nyíl) a 8. rétegben (C). HA pozitív PN egy neuron körül (nyíl) a torus semicircularis nucleus magnocellularisban (D). Intenzív a HA reakció a perikaryon (nyíl) körül és a dendritek (nyílhegy) a nucleus nervi trochlearisban (E). HA pozitív neuropil és negatív perikaryon a nucleus isthmusban (ni) (F). HA expresszió a cerebellumban (G). Intenzív festődés látható a stratum granulosumban (SGr) a kisagyi glomerulusok körül (nyíl). Lépték: A = 200 μ m, B-G = 50 μ m.

A formatio reticularisban a kissejtes periventricularis szürkeállomány az egész rhombencephalon területén gyengén festődött (14. A, C ábra). A formatio reticularis medialis és median zónájában a HA reakció közepes intenzitású, a nagy sejtek körül nagyon intenzíven festődő perineuronális háló volt látható (14. G ábra).

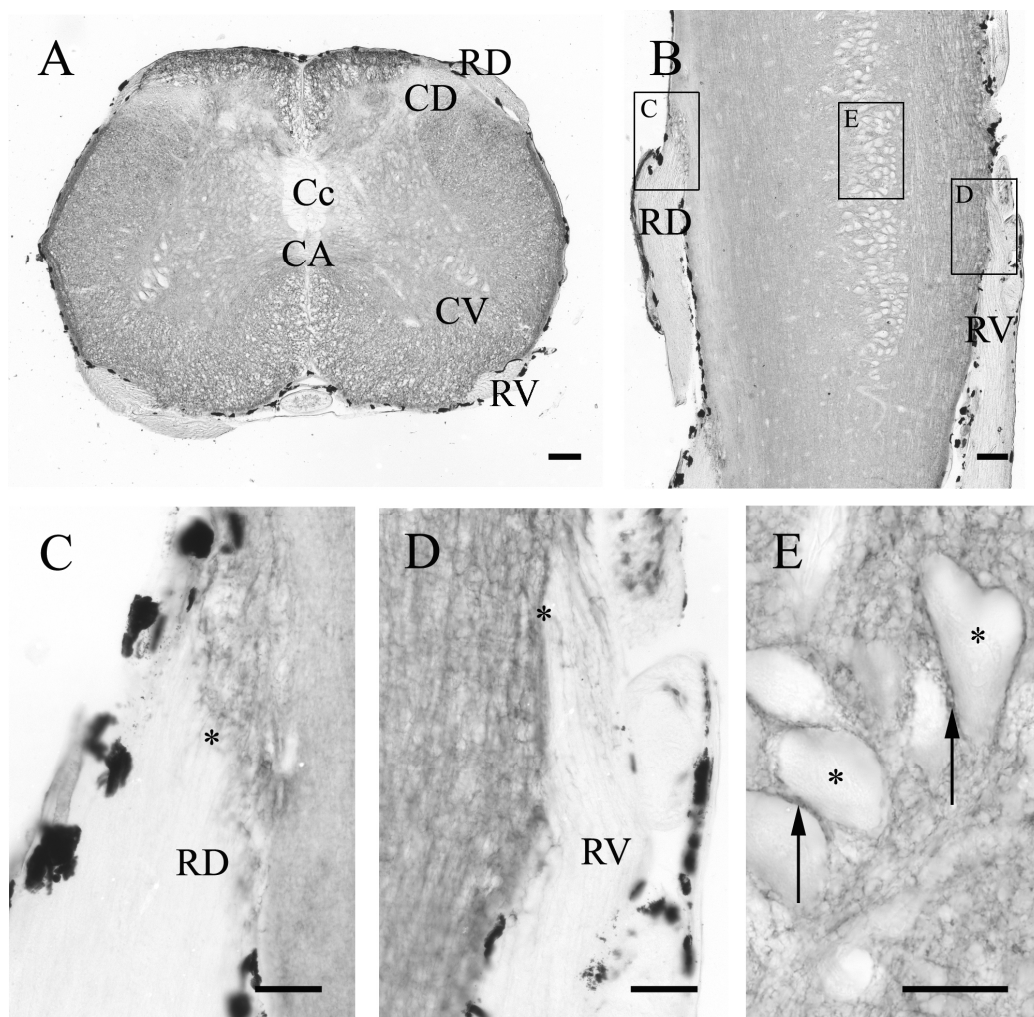
Az oliva superiorban pozitív HA reakció volt látható (14. C ábra). A rhombencephalon fehérállományában a legerősebben az érző rostokat tartalmazó tractus spinalis nervi trigemini, a tractus vestibulocochlearis és a felszálló gerincvelői kötegek festődtek (14. A, C, F ábra). A tractus solitarius és a fehérállomány subependymalis része gyengén festődött (14. A, C, F ábra).

Nagyon erős reakciót tapasztaltunk az agyidegeknek a neuraxisba való belépésénél, az átmeneti zóna területén, ezzel szemben gyenge reakció volt látható az idegek a perifériás részen (14. D ábra).

Gerincvelő A gerincvelő területén mind a szürke-, mind a fehérállományban detektáltuk HA reakciót (10. I ábra, 15. A ábra). A szürkeállományban gyengén festődő terület volt látható a hátsó szarv felszínes részén és a canalis centralis körül (15. A ábra). A mellső szarvban nagyon intenzíven festődő perineuronális háló volt látható a motoneuronok perikaryonja és a proximalis dendritek körül (15. A, B, E ábra). A fehérállományban a legerősebb reakciót a funiculus lateralis subpialis területén láthattuk. A commissura anterior is intenzíven festődött. Hasonló mintázat volt látható a funiculus dorsalis esetében kivéve a radix dorsalis belépési helyétől ventrális irányban található területet (15. B ábra). A radix ventralis és a radix dorsalis átmeneti zónája intenzíven festődött, míg maga a radix ventralis és dorsalis nagyon gyenge HA reakciót mutatott (15. C-D ábra).



14. ábra. HA eloszlás rhombencephalonban. A rhombencephalon rostralis részének keresztmetszete (A). Intenzív a HA reakció a nervus trigeminus átmeneti zónájában. A bekeretezett terület nagyobb nagyítással látható a B ábrán, ahol sötéten festődött a PN (nyilak) a nervus trigeminus motoneuronjai körül (csillag). A rhombencephalon középső szakaszának keresztmetszete (C). A bekeretezett területek nagyobb nagyítással láthatók a D, E és G ábrákon. A VIII. agyideg átmeneti zónájában (csillag) intenzív HA reakció figyelhető meg (D). Intenzív a HA reakció a PN-ban (nyilak) a nucleus vestibularis laterálisban (nvl) a perikaryon (csillag) körül (E). A rhombencephalon caudalis részének keresztmetszete (F). HA pozitív területek a perikaryon (nyíl) és a dendrit körül (nyílhegy) a formatio reticularisban (FR) (G). Csillag jelöli a perikaryont. Lépték: A, C, F = 200 μ m és B, D, E, G = 50 μ m.

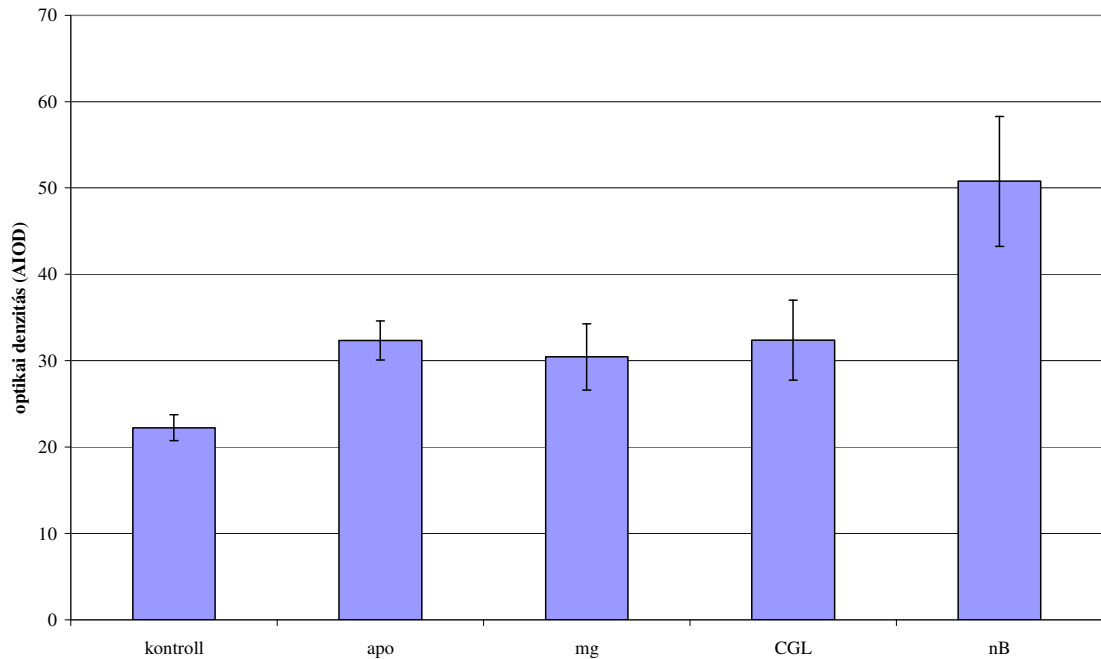


15. ábra. HA expresszió a gerincvelőben. Gerincvelő keresztmetszet (A) és hosszmetset (B). Gyenge a HA reakció a canalis centralis (Cc) és a cornu dorsale felszíni részén (CD). Intenzív a HA reakció a commissura anteriorban (CA). A bekeretezett területek nagyobb nagyítással a C-E ábrákon láthatók. A hátsó gyökér (RD) átmeneti zónája (TZ) (csillag) sötéten, míg a perifériás rész halványan festődött (C). Nem tapasztalható HA reakció a mellső gyökérnél (RV) (D). Csillag jelöli az átmeneti zónát. Sötéten festődött a PN (nyilak) a motoneuronok körül (csillagok) a mellső szarvban (CV) (E). Lépték: A, B = 200 μ m és C-E = 50 μ m.

5.1.1. Kvantitatív analízis

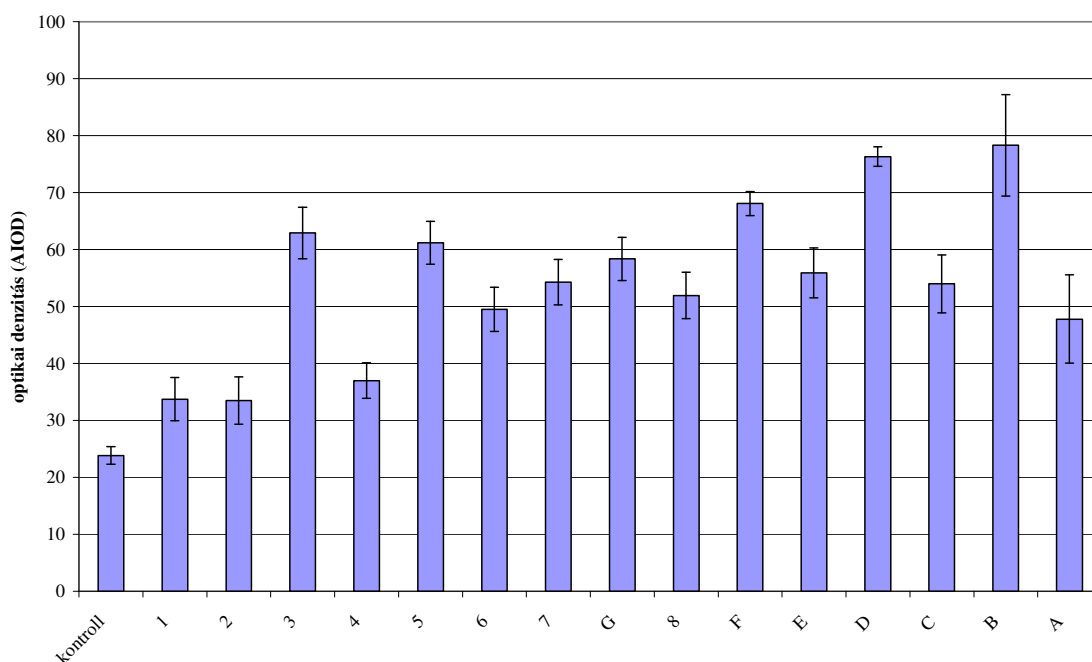
A területre vonatkoztatott optikai denzitás értékeket (AIOD=area integrated mean optical density values) a diencephalonban és mesencephalonban a nervus opticus végződési területeken vizsgáltuk. A diencephalonban a laterális előagyi köteget használtuk kontroll területként, mivel a leggyengébb HA reakciót itt detektáltuk. A HA reakció a legerősebb a

nucleus Bellonciban (nB) és a leggyengébb a nucleus preopticus magnocellularisban (mg) volt (16. ábra). A HA reakció az area preopticában (apo) és a corpus geniculatum lateraleban (CGL) erősebb volt, mint a nucleus preopticus magnocellularisban.



16. ábra. A HA reakció optikai denzitása (AIOD) a primer afferens opticus rostok végződési területein a diencephalonban. A HA reakció denzitása legnagyobb a nucleus Bellonciban (nB) és a legalacsonyabb a nucleus preopticus magnocellularisban (mg). A kontroll oszlop a lateralis előagyi kötegben mért optikai denzitás.

A tectum opticum esetében a nucleus anterodorsalis tegmenti volt a kontroll terület. A legmagasabb denzitás a B rétegben, míg a legalacsonyabb az A, 1., 2. és 4. rétegekben volt látható (17. ábra).

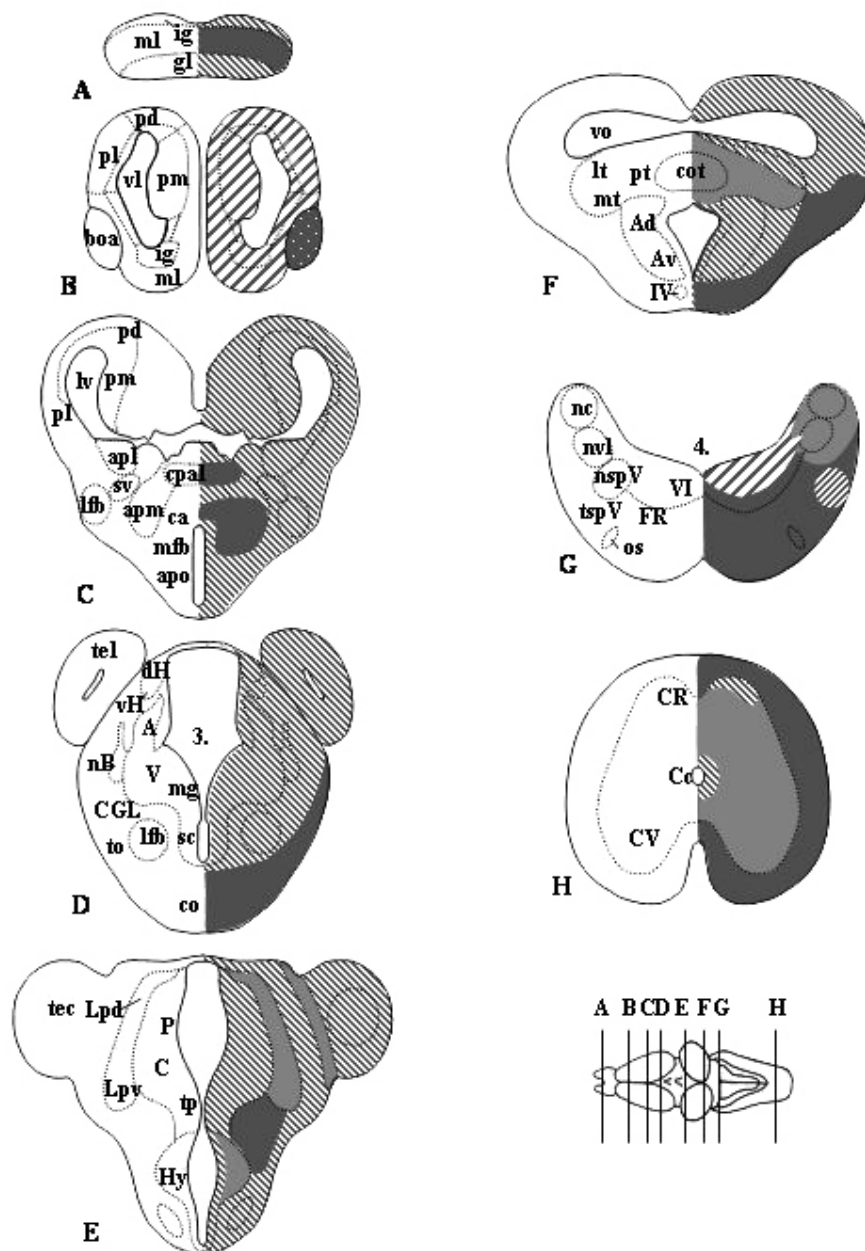


17. ábra. A HA reakció optikai densitása (AIOD) a tectum opticum rétegeiben, a rétegeket számok és betűk jelölik. A legnagyobb az optikai densitás a B, D, F, 3. és 5. rétegekben. A legalacsonyabb optikai densitást az A, 1., 2. és a 4. rétegekben mértük. A kontroll oszlop a tegmentum mesencephali nucleus anterodorsalisban mért optikai densitás.

5.2. A béka központi idegrendszerének tenascin-C térképe

A tenascin-C reakciót megfigyeltük a fehér- és a szürkeállomány különböző területein a telencephalonról a gerincvelőig (18. ábra). A reakció megjelenési formája a fehérállományban az axonok körül volt látható, míg a szürkeállományban a neuropilben és a PN területén hasonló ahhoz, amit a HA reakció esetében tapasztaltunk.

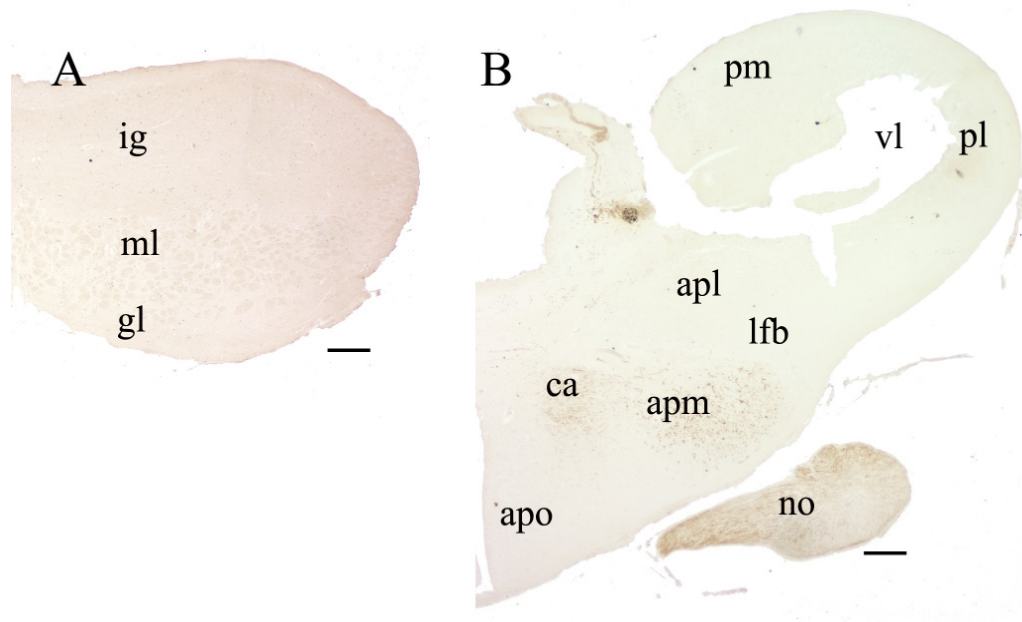
Telencephalon A tenascin-C eloszlása regionális eltérést mutatott a telencephalonban (18. A-D ábra, 19. A-B ábra). A bulbus olfactoriusban közepes intenzitású homogén reakciót tapasztaltunk mindhárom rétegben, a PN-t a HA reakcióhoz hasonlóan itt sem figyeltük meg (19. A ábra).



18. ábra. A tenascin-C reakció eloszlási mintázata a béka agy és a gerincvelő keresztmetszeteiben, a jobb oldali alsó rajz jelöli a metszetek helyét. Minden rajz baloldalán, a struktúrák, jobboldalán a tenascin-C festődés mintázata látható. A-D: telencephalon, D-E: diencephalon, F: mesencephalon, G: rhombencephalon és H: gerincvelő. A festődési mintázatot öt intenzitási fokozattal ábrázoltuk.

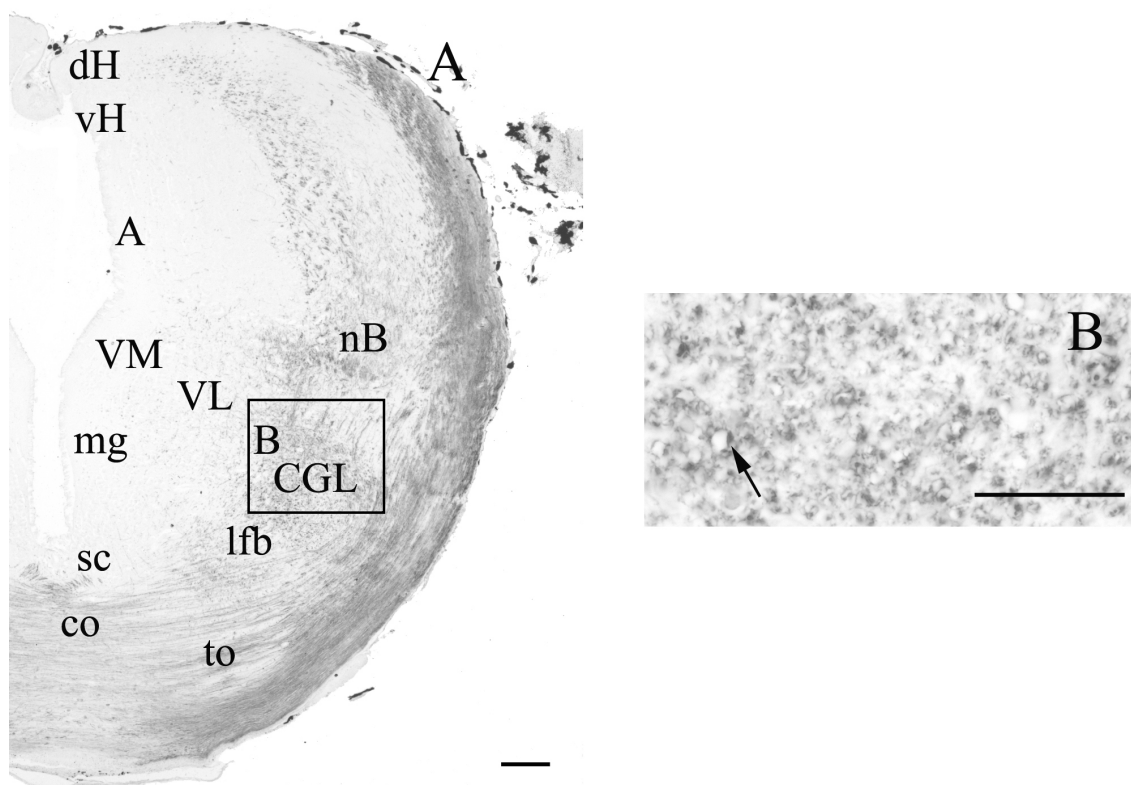
Nagyon gyenge: Gyenge: Közepes: Erős: Nagyon erős:

A pallium dorsaleban, lateraleban, medialeban és a ventriculus lateralis ependymajában gyenge tenascin C reakció volt látható (19. A ábra). Erős pozitivitást tapasztaltunk a commissura anteriorban, ahol a pozitív és negatív festődésű területek alternációja révén sávós mintázat alakult ki. A lateralis előagyi kötegben halvány tenascin-C reakciót tapasztaltunk. Az area preopticaiban halvány reakció volt megfigyelhető, nem volt látható a perineuronális háló.



19. ábra. Tenascin-C reakció a telencephalonban. Bulbus olfactorius (A) és telencephalon (B) keresztmetszet. Közepes intenzitású a tenascin-C reakció a bulbus olfactorius mindhárom rétegében (A). Intenzív tenascin-C reakció látható az amygdala pars medialisban (apm), commissura anteriorban (ca) és a nervus opticusban (no), a palliumban halvány reakció látható (B). Lépték = 200 μ m.

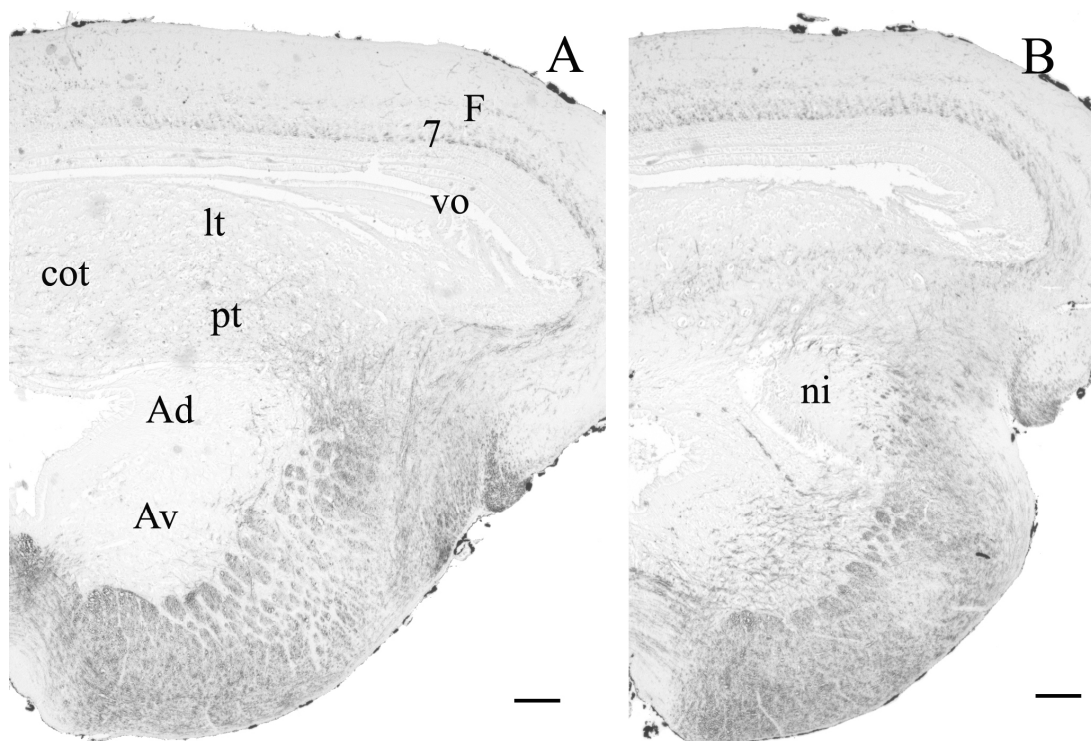
Diencephalon A telencephalonhoz hasonlóan a tenascin-C reakció eloszlása és intenzitása regionális eltéréseket mutatott (18. D-E ábra, 20. A ábra). A corpus geniculatum laterale és a lateralis előagyi köteg erős tenascin-C reakciót mutatott, míg a thalamus területén gyenge reakció volt látható (18. D ábra, 20. A ábra). A lateralis előagyi kötegben halvány festődés volt látható, de intenzívebb volt, mint a telencephalonban.



20. ábra. Tenascin-C reakció a diencephalonban. Diencephalon keresztmetszet (A). A bekeretezett terület nagyobb nagyítással a B ábrán. A nucleus Bellonciban közepes intenzitású inhomogén a reakció. Intenzív a tenascin-C reakció a chiasma opticumban és a tractus opticusban (A). A corpus geniculatum lateraleban intenzíven festődött a perineuronális háló (nyíl) a perikaryon körül (B). Lépték: A = 200 μ m; B = 50 μ m.

A nucleus Bellonciban közepes intenzitású inhomogén reakciót láttunk (20. A ábra). A CGL-ban nagy nagyítással látható a PN a perikaryonok körül (20. B ábra). Erős tenascin-C reakció volt látható a nervus opticusban, chiasma opticumban és a tractus opticusban.

Mesencephalon A tectum opticumban a G, F, 8. és a 7. rétegekben volt látható erősebb immunreakció, gyengébb reakciót tapasztaltunk az 5., 6., B, C, D és E rétegekben, míg nagyon gyenge volt a reakció az A, 1., 2., 3. és 4. rétegekben (18. F ábra, 21. A, B ábra). A PN jól látható volt a 7. és az F rétegekben (21. A ábra). A tegmentum mesencephaliban a szürkeállomány közepesen intenzíven festődött a torus semicircularis subependymalis, principalis, magnocellularis, laminaris és commissuralis magjaiban.



21. ábra. Tenascin-C reakció a mesencephalonban. A mesencephalon rostralis részének keresztmetszete (A). Erős tenascin-C reakció látható a tectum opticum G, F, 8. és 7. rétegeiben. Közepesen intenzíven festődtek a torus semicircularis magjai (cot, lt, pt). A mesencephalon caudalis részének keresztmetszete (B). A nucleus isthmi (ni) széli része intenzíven, a neuropil halványan festődött (B). Lépték: A, B = 200 μ m.

A tegmentum mesencephali nucleii anterodorsalis és anteroventralis gyengén festődtek (21. A ábra). A tegmentum fehérállományában a tenascin-C reakció intenzitása regionális eloszlást mutatott, a legerősebb reakció a subpialis zónában volt látható. Erős tenascin-C reakció volt látható a BON-ban. A nucleus isthmiben a széli rész sötétén, a neuropil világosan festődött (21. B ábra).

Cerebellum A kisagy minden rétegében detektáltunk tenascin-C reakciót, a legerősebben a Purkinje sejtek rétege festődött, ahol tenascin-C reakciót mutató területek voltak láthatóak a negatív kör alakú területek körül (22. A ábra), amelyek a Purkinje sejtek perikaryonját jelezték.

Rhombencephalon A tenascin-C reakció intenzitása különbségeket mutatott a szürkeállomány különböző területein (18. G ábra, 22. A, C, D ábra). Az érző agyidegi magok, mint a nucleus cochlearis és a nucleus vestibularis lateralis (Deiters mag) neuronjai körül is pozitív tenascin-C reakciót figyelhettünk meg, különösen erős volt a reakció a Deiters

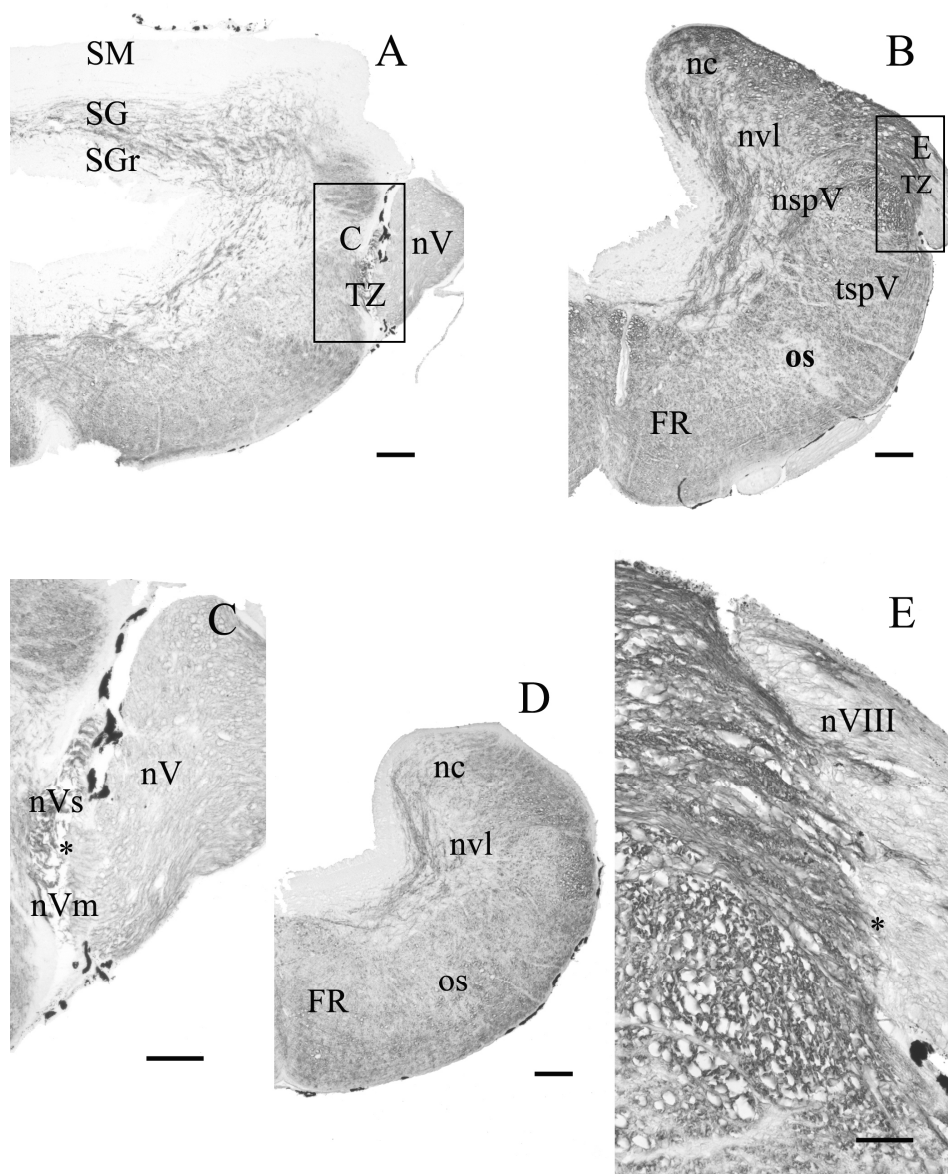
magban (22. C ábra). A motoros agyidegi magok körül a perineuronális háló gyengébben festődött (22. D ábra).

A formatio reticularisban, a kissejtes periventricularis szürkeállomány az egész rhombencephalon területén gyengén festődött (22. A, C, D ábra). A formatio reticularis medialis és median zónájában a tenascin-C reakció közepes intenzitású, a nagy sejtek körül nagyon intenzíven festődő perineuronális háló volt látható (22. D ábra).

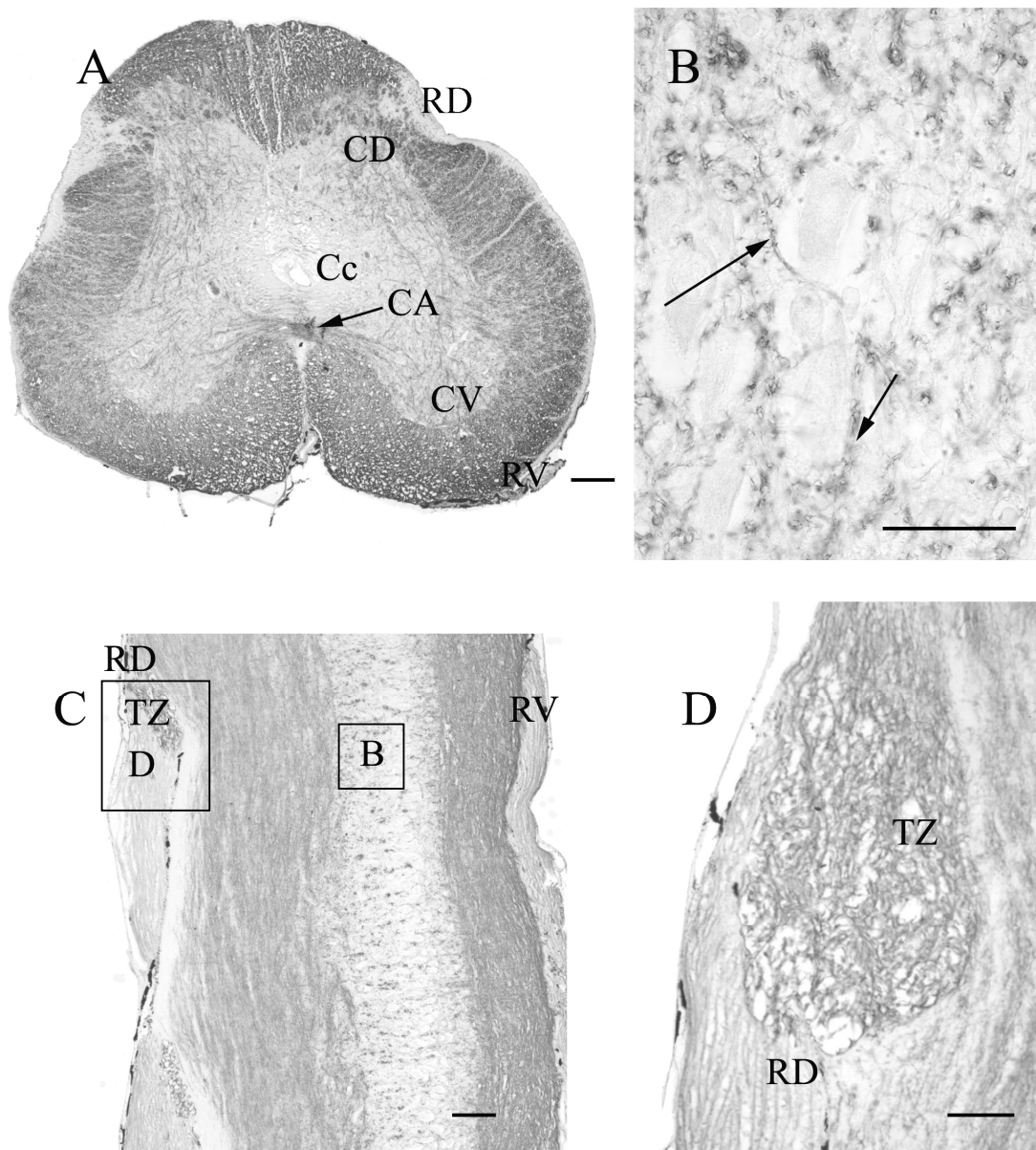
Az oliva superiorban közepesen intenzív tenascin-C reakció volt látható (22. D ábra). A rhombencephalon fehérállományában a legerősebben az érző rostokat tartalmazó tractus spinalis nervi trigemini, a tractus nervi vestibulocochlearis és a felszálló gerincvelői kötegek festődtek (22. C, D ábra).

Nagyon erős reakciót tapasztaltunk a motoros és érző agyidegek belépésénél az átmeneti zónában, ezzel szemben gyenge reakció volt látható a perifériás részen (22. B, E ábra). A tractus solitarius és a fehérállomány subependymalis része gyengén festődött (22. A, C, D ábra).

Gerincvelő A gerincvelő szürke- és fehérállományában is detektáltunk tenascin-C reakciót (18. H ábra, 23. A, C ábra). A mellső szarvban nagyon intenzíven festődött a perineuronális háló a motoneuronok perikaryonjai és a proximalis dendritjei körül (23. D ábra). A fehérállományban a legerősebb reakciót a funiculus lateralis subpialis területén láthattuk. Erősen festődött a commissura anterior. A radix dorsalis átmeneti zónája nagyon intenzíven festődött, a radix ventralis átmeneti zónája közepesen intenzív tenascin-C reakciót mutatott, míg az ideg perifériás része halványan festődött. (23. B ábra).



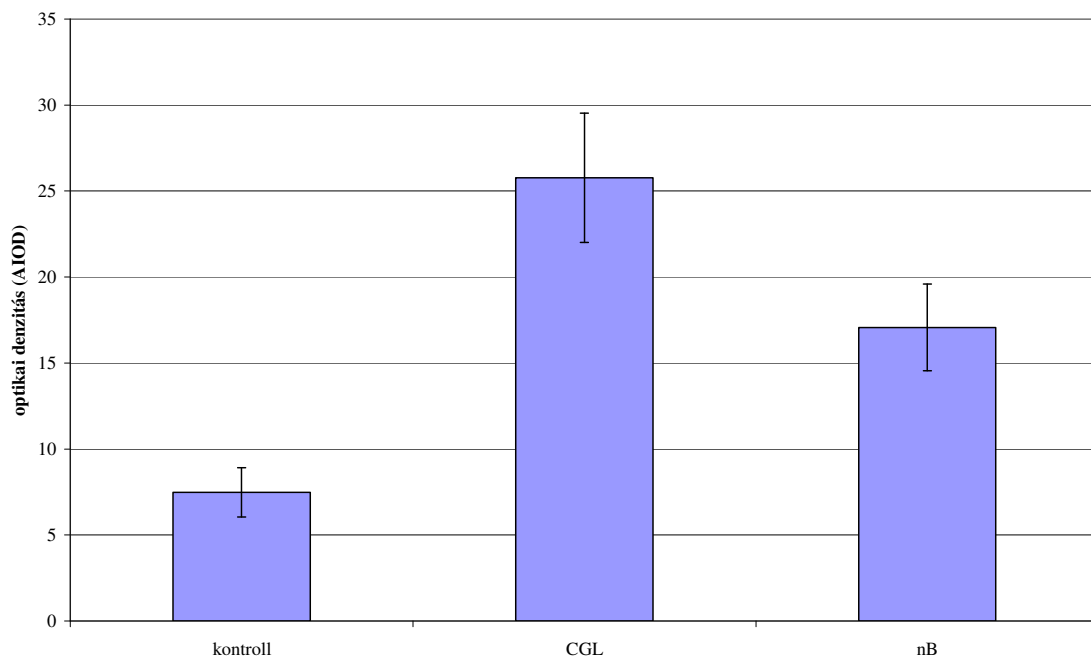
22. ábra. Tenascin-C reakció a rhombencephalonban. A rhombencephalon rostralis részének keresztmetszete a cerebellummal (A). A bekeretezett terület nagyobb nagyítással látható a C ábrán. Intenzív tenascin-C reakció látható a cerebellumban a Purkinje sejtek rétegében (SG), a másik két rétegben halvány a reakció. A rhombencephalon középső részének keresztmetszete (B). A bekeretezett terület nagyobb nagyítással látható az E ábrán. Az V. agyideg átmeneti zónájában (csillag) intenzív a tenascin-C reakció figyelhető meg (C). A rhombencephalon caudalis részének keresztmetszete (D). A VIII. agyideg átmeneti zónájában (csillag) intenzív a tenascin-C reakció (E). Lépték: A, C, D = 200 μ m; B, E = 50 μ m.



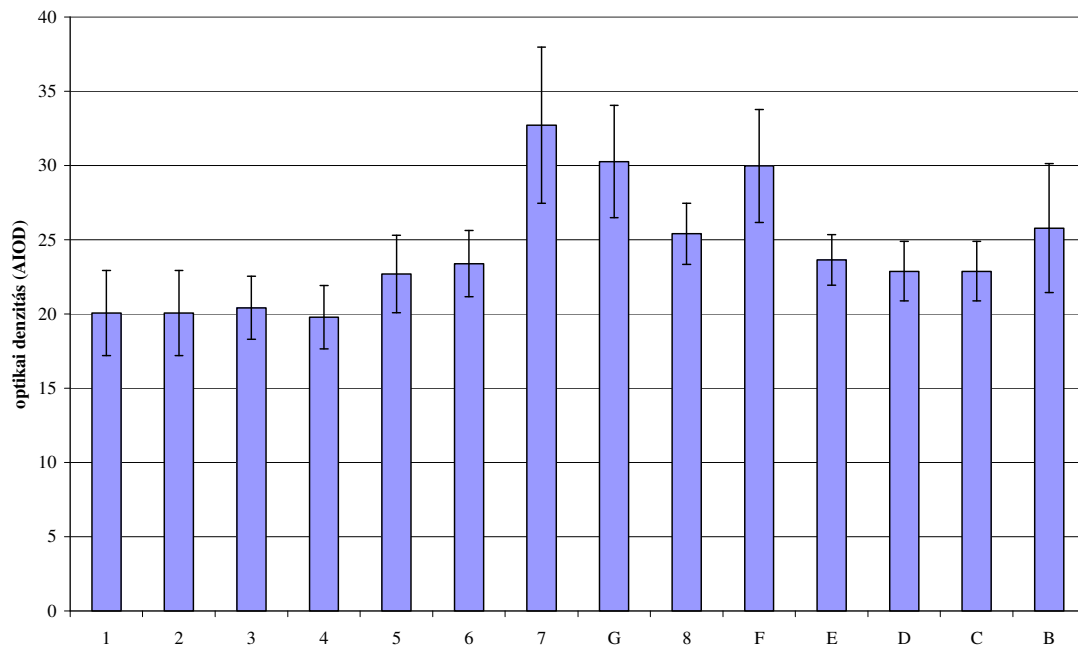
23. ábra. Tenascin-C reakció a gerincvelőben. Gerincvelő keresztmetszet (A) és hosszmetset (C). A bekeretezett területek nagyobb nagyítással a B és D ábrákon láthatók. Intenzív tenascin-C reakció figyelhető meg a fehérállományban a commissura anteriorban (CA) (nyíl) (A). Sötétén festődött PN (nyilak) látható a motoneuronok körül (B). Intenzív a tenascin-C reakció a radix dorsalis (RD) átmeneti zónájában (D), míg az ideg perifériás része halványan festődött. Lépték: A, C = 200 μ m; B, D = 50 μ m.

5.2.1. Kvantitatív analízis

A területre vonatkoztatott optikai denzitás értékeket (AIOD=area integrated mean optical density values) a diencephalonban és mesencephalonban található opticus végződési területeken vizsgáltuk. A diencephalonban a nucleus suprachiasmaticus használtuk kontroll területként, mivel a leggyengébb tenascin-C reakciót itt detektáltuk. A tenascin-C reakció a legerősebb a corpus geniculatum lateraleban, leggyengébb a nucleus Bellonciban (nB) (24. ábra). A tectum opticum esetében a nucleus anterodorsalis tegmenti volt a kontroll terület. A legmagasabb denzitás a 7. és a G rétegekben, míg a legalacsonyabb az 1., 2., 3. és 4. rétegekben volt látható (25. ábra).



24. ábra. A tenascin-C optikai denzitása (AIOD) a primer afferens opticus rostok végződési területein a diencephalonban. A tenascin-C reakció denzitása a legnagyobb a corpus geniculatum lateraleban (CGL) és a legalacsonyabb a nucleus Bellonciban (nB). A kontroll oszlop a nucleus suprachiasmaticusban mért optikai denzitás.

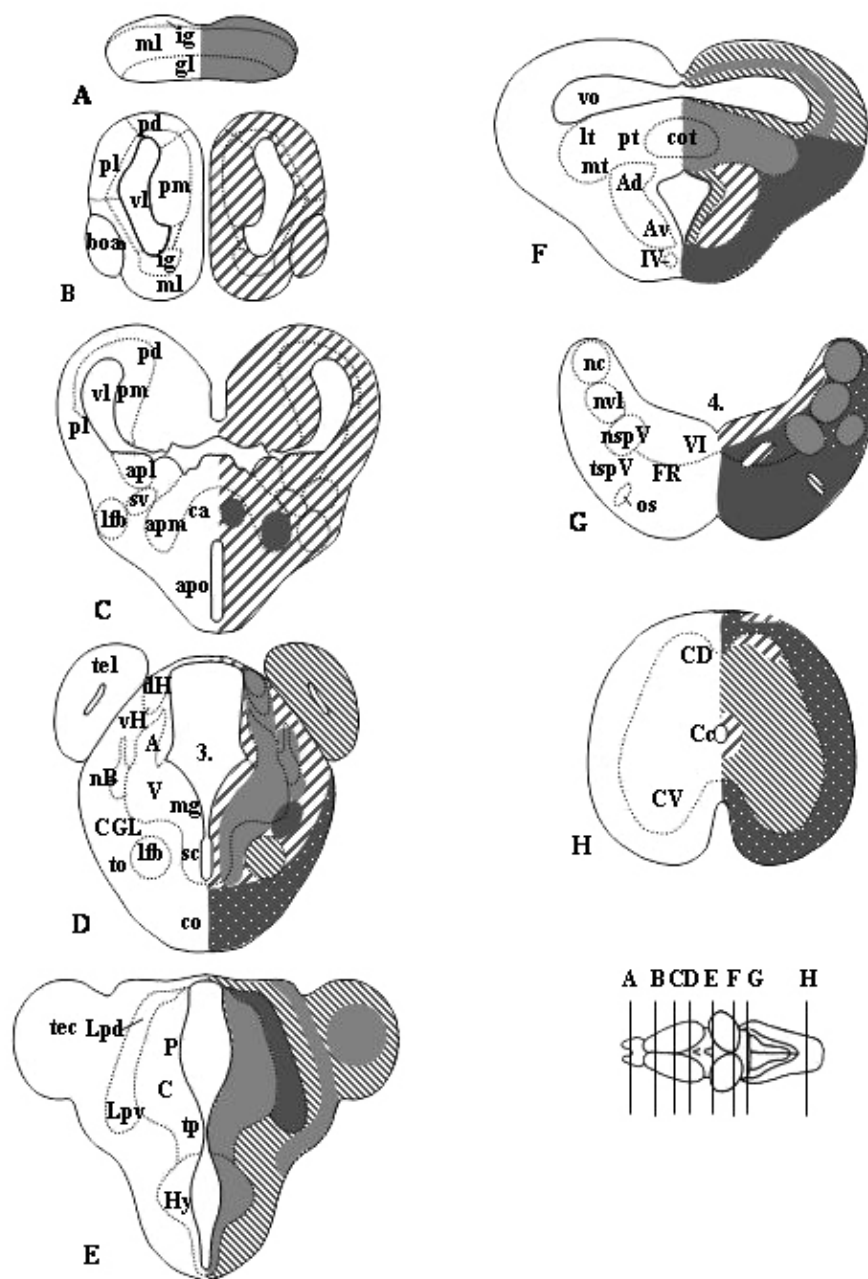


24. ábra. A tenascin-C reakció optikai denzitása (AIOD) a mesencephalonban a tectum opticum rétegeiben. A legnagyobb az optikai denzitás a 7., G, 8. és F rétegekben. A legalacsonyabb az optikai denzitás az 1., 2., 3. és 4. rétegekben.

5.3. A béka központi idegrendszerének fibronectin térképe

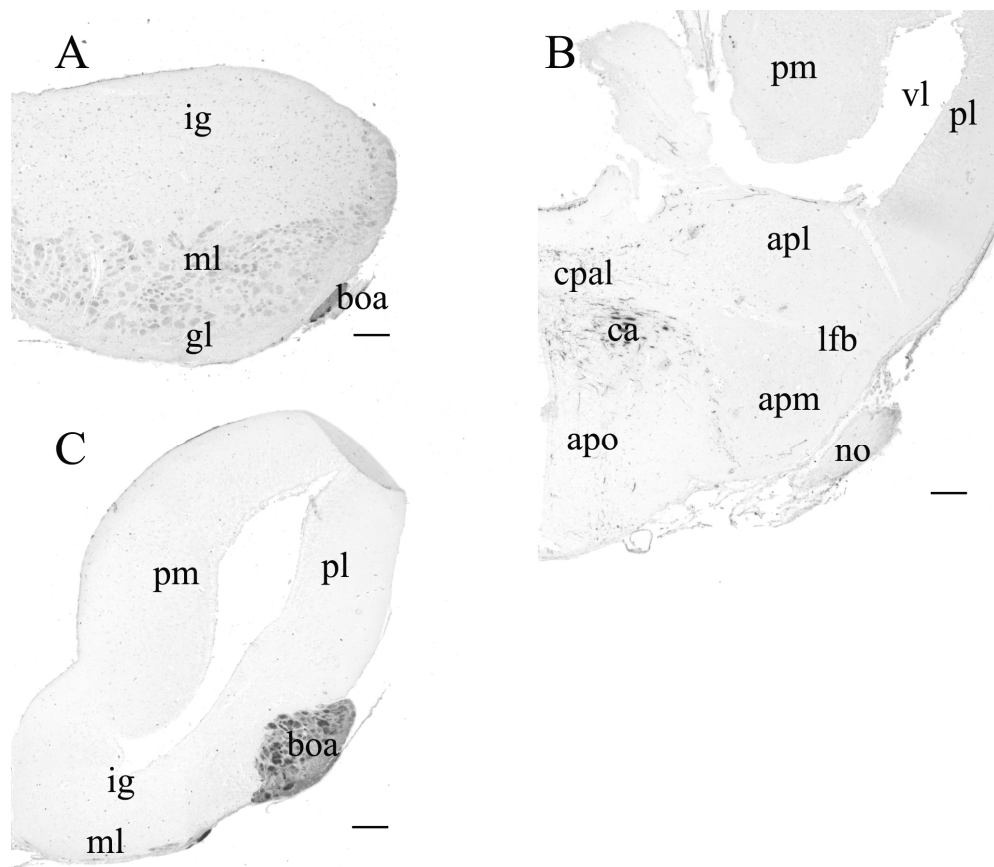
A fibronectin reakciót megfigyeltük a fehér- és a szürkeállomány különböző területein a telencephalonról a gerincvelőig (26. ábra). A fehérállományban az axonok körül volt látható reakció. A HA-tól és tenascin-C-től eltérően a szürkeállományban a neuronok citoplazmájában tapasztaltunk intenzív fibronectin reakciót, de a PN-ban nem. A neuropil pozitív volt fibronectinre.

Telencephalon A fibronectin eloszlása regionális eltérést mutatott a telencephalonban (26. A-D ábra, 27. A, B ábra). A bulbus olfactorius mitralis sejt rétegében nagy intenzitású homogén reakciót tapasztaltunk a mitralis sejtekben (27. A ábra). A stratum glomerulare és a stratum granulosum internum halványan, míg a bulbus olfactorius accessorius intenzíven festődött.



26. ábra. A fibronektin reakció eloszlási mintázata a béka agy és gerincvelő keresztmetszeteiben, a jobb oldali alsó rajz jelöli a metszetek helyét. Minden rajz baloldalán, a struktúrák, jobboldalán a fibronektin festődés mintázata. A-D: telencephalon, D-E: diencephalon, F: mesencephalon, G: rhombencephalon és H: gerincvelő. A festődési mintázatot öt intenzitási fokozattal ábrázoltuk.

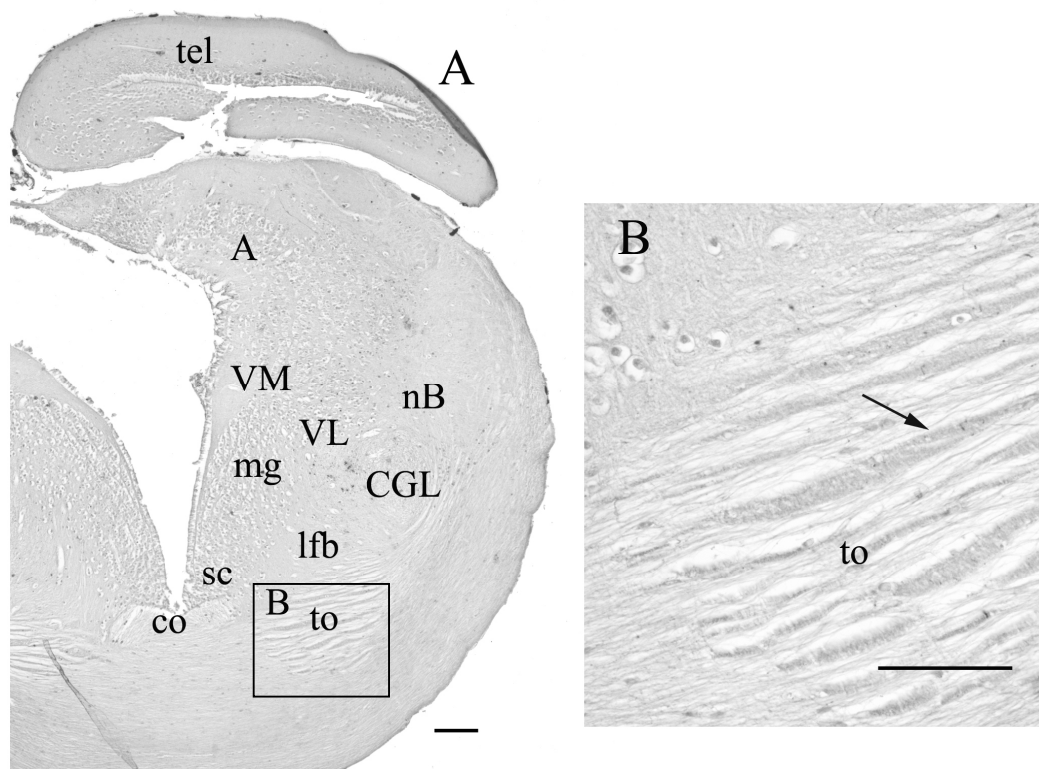
Nagyon gyenge: Gyenge: Közepes: Erős: Nagyon erős:



27. ábra. Fibronectin reakció a telencephalonban. Bulbus olfactorius keresztmetszet (A). Legerősebb a fibronectin reakció a bulbus olfactorius accessoriusban látható (A, C). Intenzív reakció látható a stratum mitraleban (ml) a bulbus olfactoriusban (A). Telencephalon keresztmetszet (B). Erős a fibronectin reakció látható a commissura anteriorban (ca) és a commissura palliiban (cpal) (B). Lépték = 200 μ m.

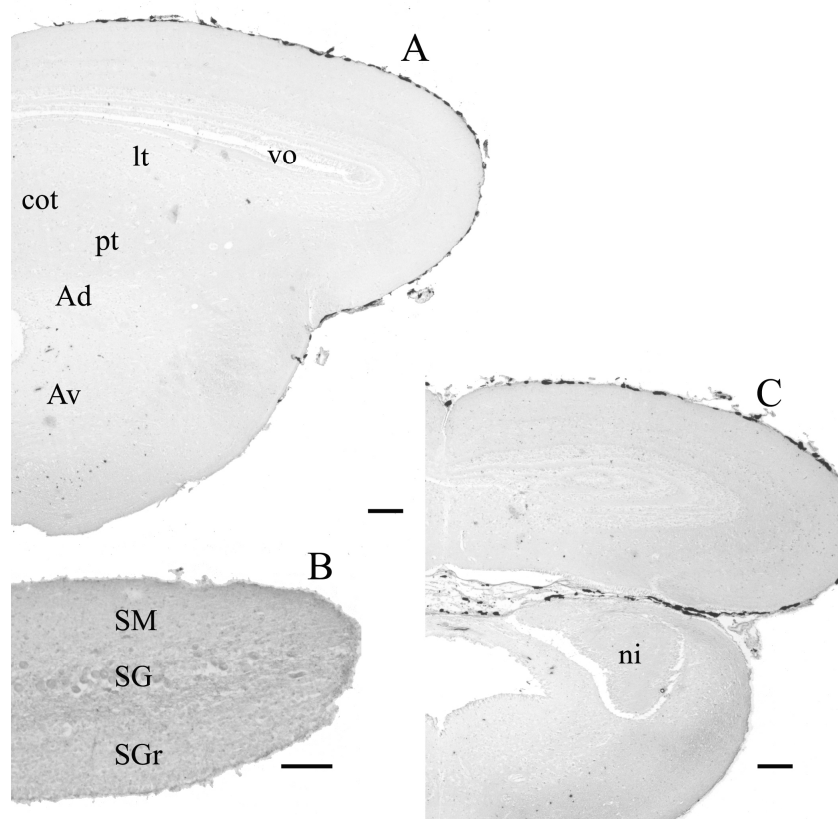
A palliumban, az amygdala pars medialisban, a lateralis előagyi kötegben és az area preopticanban gyenge fibronectin reakció volt látható (27. B ábra). Erős pozitívítást tapasztaltunk a commissura anteriorban és a commissura palliiban, ahol a pozitív és negatív festődésű területek alternációját figyeltük meg.

Diencephalon A CGL, a nB és a thalamus területén közepesen intenzív volt a fibronectin reakció intenzitása. A lateralis előagyi köteg halványan festődött. A nervus opticus, a chiasma opticum és a tractus opticus erősen festődött (26. D-E ábra, 28. A ábra). A tractus opticusban az opticus rostok között intenzívebben festődött, mint az opticus rostok.



28. ábra. Fibronectin reakció a diencephalonban. Diencephalon keresztmetszet (A). A bekeretezett terület nagyobb nagyítással látható a B ábrán. Közepesen intenzív homogén fibronectin reakció látható a corpus geniculatum lateraleban (CGL) és a nucleus Bellonciban (nB) (A). Intenzív a fibronectin reakció a tractus opticusban (to) az opticus rostok között (nyíl) (B). Lépték: A = 200 μ m; B = 50 μ m.

Mesencephalon A tectum opticumban közepes intenzitású homogén reakció volt látható, a rétegek között nincs jelentős intenzitásbeli különbség (26. F ábra, 29. A, C ábra). A tegmentum mesencephaliban a szürkeállomány közepesen intenzíven festődött a torus semicircularis magjaiban (29. A ábra). A nucleus anterodorsalis és anteroventralis tegmenti nagyon halványan festődött (29. A ábra). A tegmentum fehérállományában a fibronectin reakció intenzitása regionális eloszlást mutatott, a legerősebb reakció a subpialis zónában volt látható. A BON-ban halvány reakciót figyeltünk meg. A nucleus isthmi közepesen intenzíven festődött, nincs intenzitásbeli eltérés a széli rész és a neuropil között.

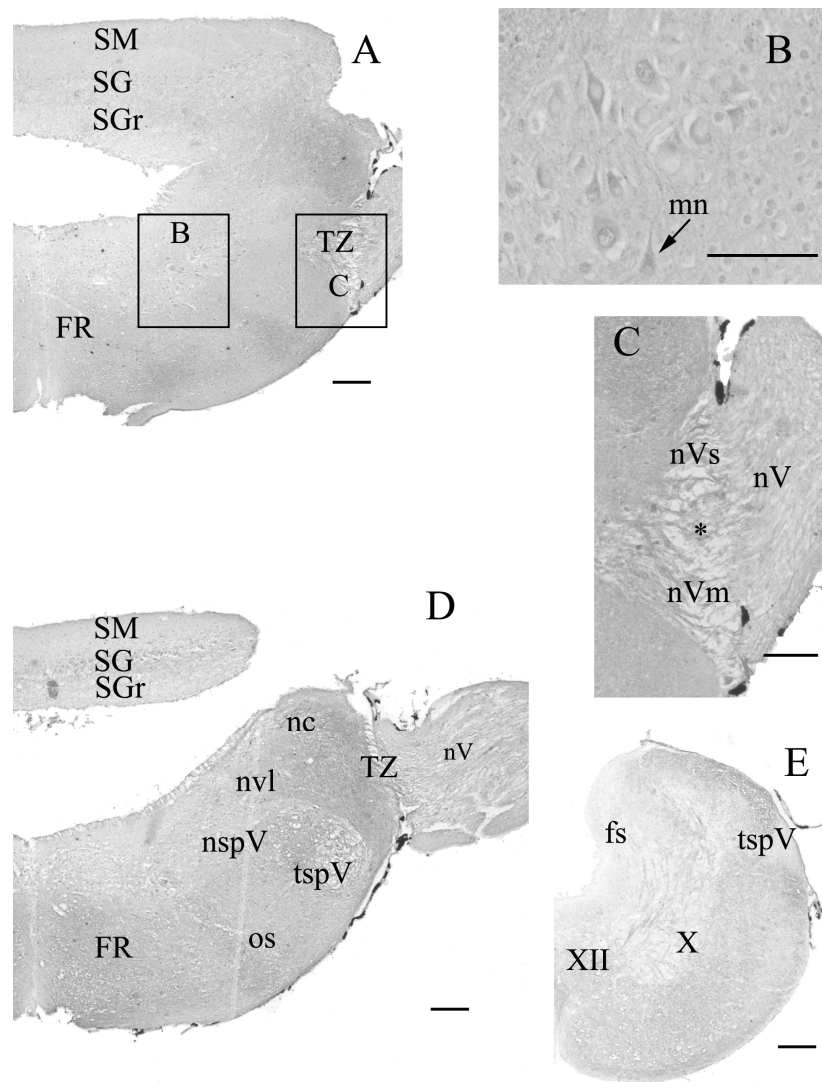


29. ábra. Fibronektin reakció a mesencephalonban. A mesencephalon rostralis (A) és caudalis részének (C) keresztmetszete. A tectum opticumban közepesen intenzív a fibronektin reakció. A nucleus isthmi közepesen intenzíven festődött (ni). A cerebellum keresztmetszete (B). A három rétegből a stratum ganglionareban a Purkinje sejtek citoplazmája (SG) és stratum granulosum (SGr) festődött a legerősebben (B). Lépték: A, B = 200 μ m; 50 μ m.

Cerebellum A kisagy minden rétegében detektáltunk fibronektin reakciót, a legerősebben a Purkinje sejtek és a szemcsesejtek festődtek (29. C ábra).

Rhombencephalon A fibronektin reakció nagy intenzitásbeli különbségeket mutatott a rhombencephalonban, mint az agy más területein (26. G ábra, 30. A, D, E ábra). A motoros agyidegi magokban pozitív fibronektin reakció volt megfigyelhető (30. A, B ábra).

A formatio reticularisban, a kissejtes periventricularis szürkeállomány az egész rhombencephalon területén erősen festődött (30. A, D ábra). A formatio reticularis medialis és median zónájában a fibronektin reakció közepes intenzitású volt, a nagy sejtek nagyon intenzíven festődtek (30. D ábra).

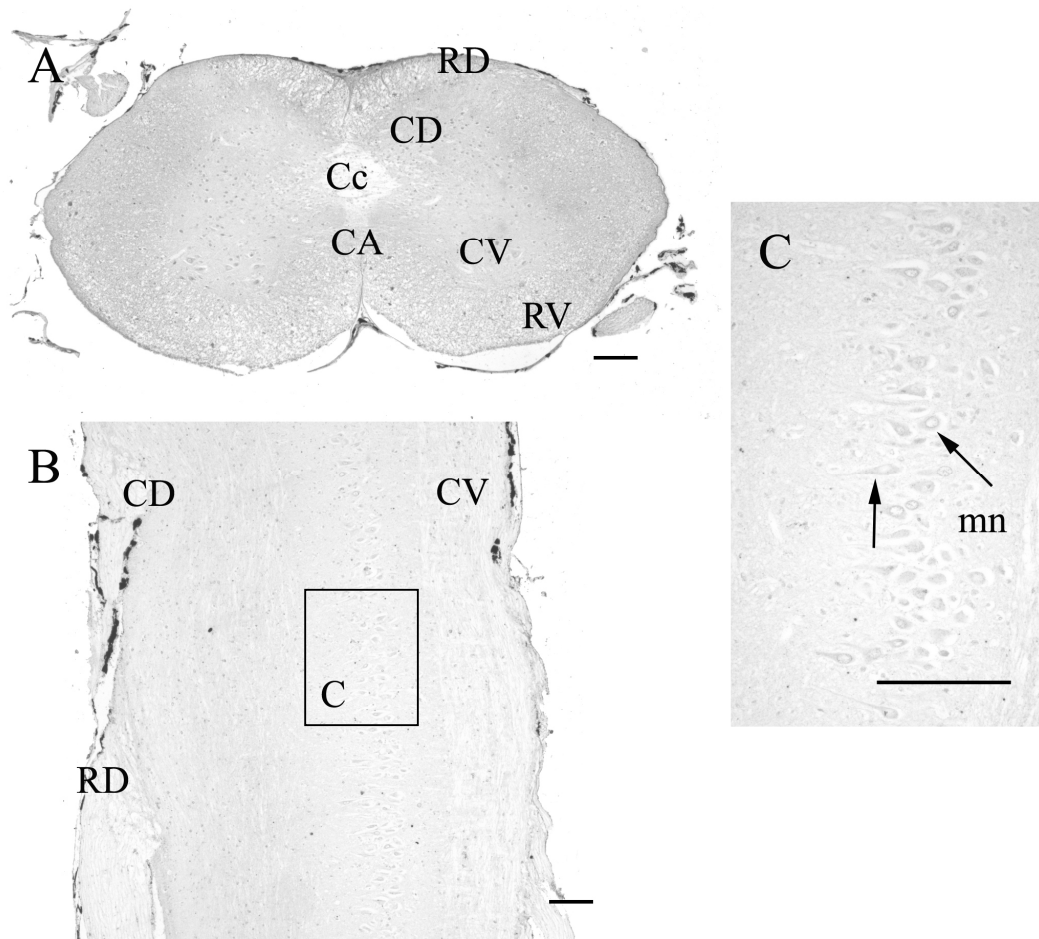


30. ábra. Fibronectin reakció a cerebellumban és a rhombencephalonban. A rhombencephalon rostralis részének keresztmetszete (A, D). A bekeretezett területek nagyobb nagyítással láthatók a B és C ábrán. Intenzív a fibronectin reakció a rhombencephalonban a formatio reticularisban (A, D). A trigeminus motoneuronjainak citoplazmája (mn) (nyíl) nagyon intenzíven festődött (B). Intenzíven festődött a nervus trigeminus átmenet zónája (csillag) (C). Rhombencephalon caudalis részének keresztmetszete (E). Gyengén festődött a fasciculus solitarius (fs). Lépték: A, D, E = 200 μ m; B, C = 50 μ m.

Az oliva superiorban pozitív fibronectin reakció volt látható (26. G ábra). A rhombencephalon fehérállományában a legerősebben az érző rostokat tartalmazó tractus nervi trigemini és a tractus nervi vestibulocochlearis és a felszálló gerincvelői kötegek festődtek (30. D ábra). A tractus solitarius és a fehérállomány subependymalis része gyengén festődött (30. E ábra).

Nagyon erős reakciót tapasztaltunk a motoros és érző agyidegeknek a neuraxisba való belépésénél, az idegek perifériás részen erős reakciót figyeltünk meg (30. A, C, D ábra).

Gerincvelő A gerincvelő szürke- és fehérállományában is detektáltunk fibronectin reakciót (26. H ábra, 31. A ábra). A mellső szarvban nagyon intenzíven festődtek a motoneuronok és proximalis dendritjeik (31. B ábra). A fehérállományban a legerősebb reakciót a funiculus lateralis subpialis területén láttunk és közepesen intenzíven a commissura anterior rostjai. A perifériás ideg is erősen festődött.

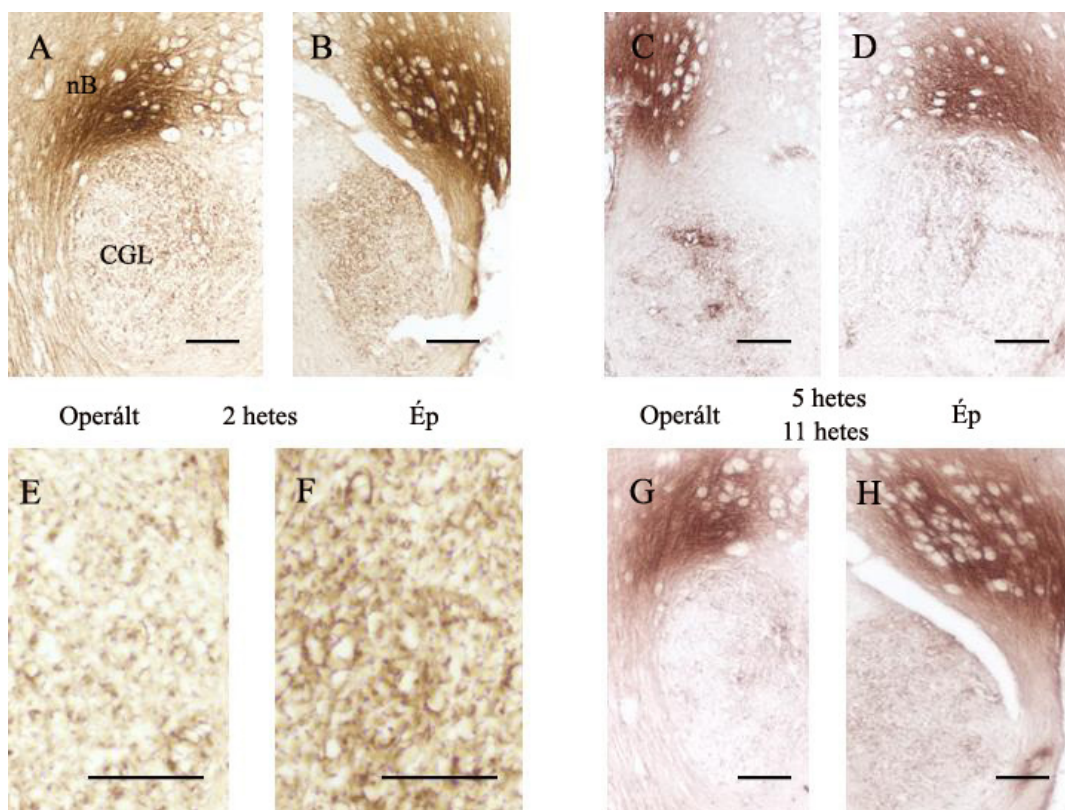


31. ábra. Fibronectin reakció a gerincvelőben. Gerincvelő keresztmetszet (A) és hosszmetset (B). A bekeretezett terület nagyobb nagyítással látható a C ábrán. A mellső szarvban a motoneuronok (mn) citoplazmája (nyíl) erősen festődött (C). Lépték: A = 200 μ m; B = 50 μ m.

5.4. Nervus opticus regenerációs vizsgálatok

5.4.1. A HA reakció változása a béka látóközpontjaiban a regeneráció során

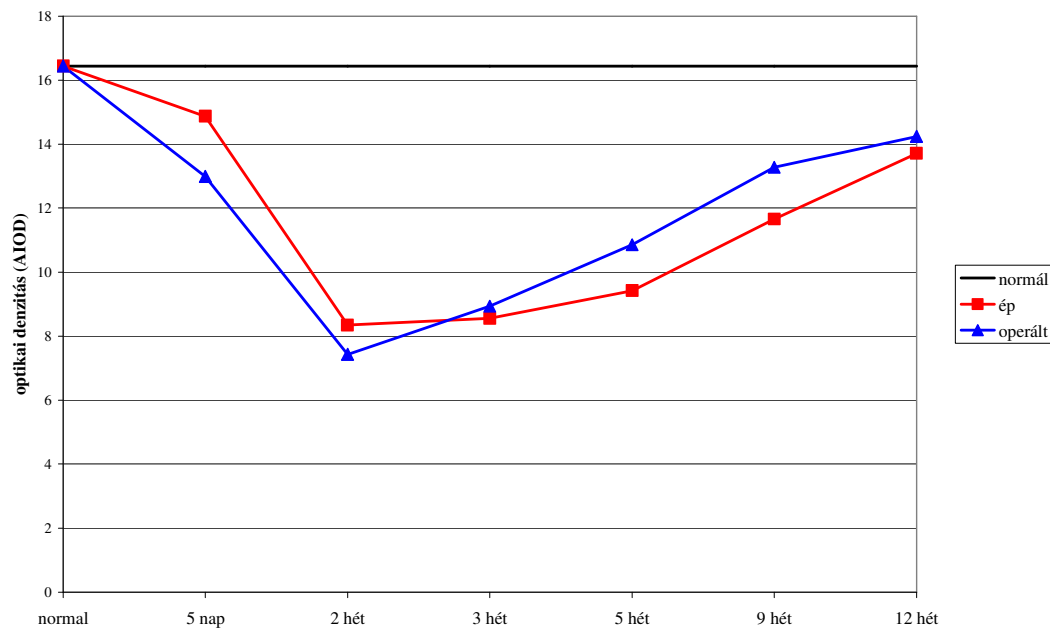
A kísérletek során ép oldalnak mindig azt az oldalt tekintettük mind a diencephalonban, mind a mesencephalonban, ahol az ép nervus opticus rostok végződnek. A regenerációs kísérletek során a normál, nem operált állathoz hasonlóan a HA reakciót a szürke- és a fehérállomány területén is megfigyeltük. Minden túlélési stádium esetében a HA reakciót a diencephalonban a corpus geniculatum laterale és a nucleus Bellonci területén (10. D ábra), míg a mesencephalonban a tectum opticum rétegeiben és a basalis opticus magban vizsgáltuk részletesebben (10. D ábra).



32. ábra. HA reakció a nB-ban és CGL-ban a diencephalonban nervus opticus regeneráció során. A festődés intenzitása a nB-ban kevésbé csökkent, mint a CGL-ban. Az E és F ábrán nagyobb nagyítással látható a CGL a második túlélési héten (A, B). A második posztoperatív héten volt megfigyelhető a PN dezintegráltsága. Lépték = 50 μ m.

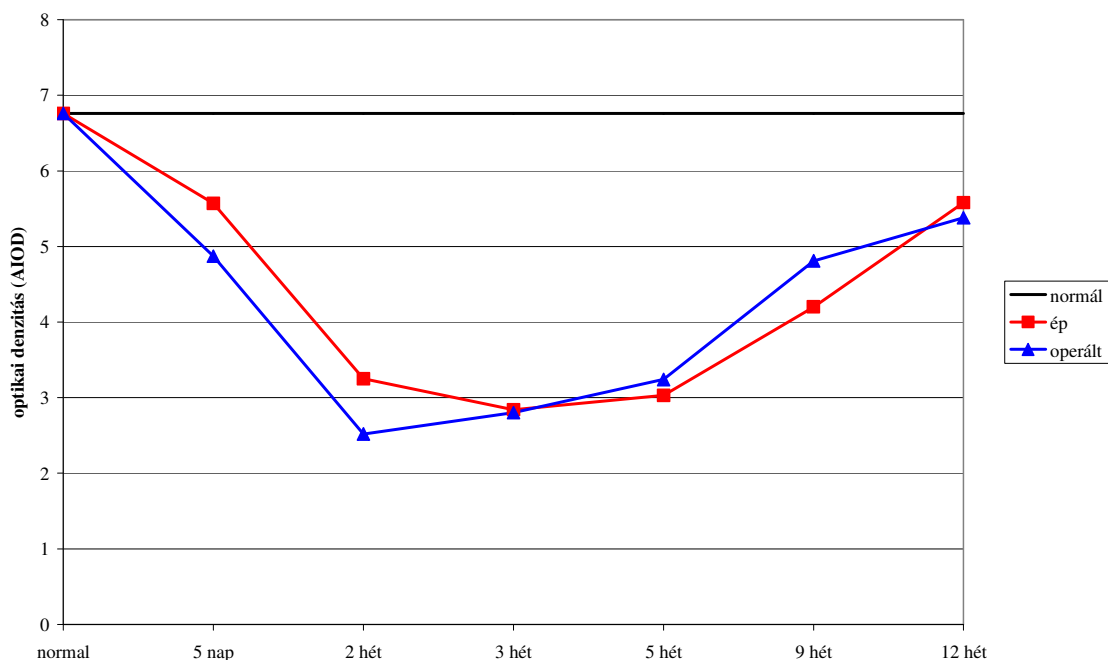
Diencephalon A nucleus Bellonciban az operált és az ép oldalról rostokat fogadó két oldal között nem volt jelentős különbség a HA reakció megjelenésében a vizsgált időpontokban

(32. ábra). A normál békához viszonyítva az ötödik naptól kezdve mindkét oldalon csökkent az optikai denzitás, az operált oldalon volt nagyobb, de nem szignifikánsan a csökkenés mértéke. Az optikai denzitás értéke a második túlélési héten a normál békában mért értékek felére csökkent mindkét oldalon. Az operált oldalon a második, az ép oldalon a harmadik héttől kezdve nőtt a HA reakció optikai denzitása, a növekedés üteme a regenerálódó rostokat fogadó oldalon nagyobb volt, mint a másik oldalon. A tizenkettedik túlélési hétre a mért optikai denzitás értékek megközelítették a normál állatban mért értékeket (33. ábra).



33. ábra. A HA reakció optikai denzitásának (AIOD) időbeni változása a nB-ban nervus opticus regeneráció során. Az operált oldalon minden túlélési stádiumban nagyobb mértékű a változás, mint az ép oldalon. A normál érték a nem operált állatnál mért optikai denzitást jelzi.

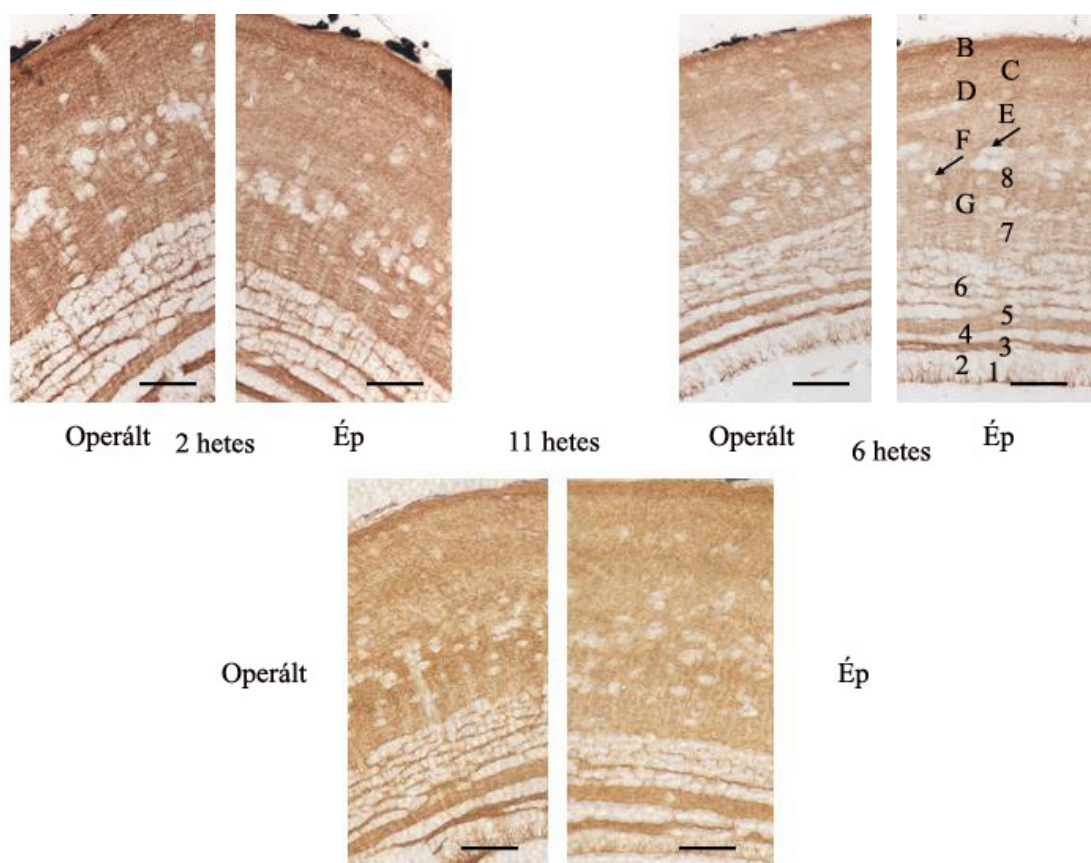
A corpus geniculatum lateraleban az operált oldalon a perineuronális háló dezintegráltságát figyeltük meg, ami a második túlélési héten volt a legkorábban látható. Az ötödik túlélési hétre ez a jelenség eltűnt, és a PN háló festődése újra megfigyelhető volt, de az operált oldalon jelentősebb volt a csökkenés (32. ábra). Az optikai denzitás értéke a második-harmadik túlélési héten a nucleus Belloncihoz hasonlóan a normál békában mért értékek felére csökkent mindkét oldalon. Az ötödik hét után tapasztalt növekedés üteme is a nucleus Belloncinál tapasztaltnál hasonló volt (34. ábra).



34. ábra. HA reakció optikai denzitásának (AIOD) időbeni változása nervus opticus regeneráció során a CGL-ban. Az operált oldalon minden túlélési stádiumban nagyobb mértékű a változás, mint az ép oldalon. A normál érték a nem operált állatnál mért optikai denzitást jelzi.

Mesencephalon A normál, nem operált békához hasonlóan minden túlélési stádiumban a tectum opticum rétegeiben és a nucleus opticus basalisban vizsgáltuk a HA reakció változását az operált és az ép oldalon az idő függvényében. Általánosságban elmondható, hogy a mesencephalonban minden túlélési stádiumban a tectum opticum rétegeiben a normál békához hasonlóan a HA reakció intenzitása a B és a D rétegekben volt a legmagasabb és a 2. és 4. rétegekben a legalacsonyabb (36. A-B ábra). A B rétegben mindkét oldalon minden stádiumban nagyobb volt az AIOD, mint a többi rétegben (36. A-B ábra). Az F és 8. rétegben a perineuronális háló festődése és a 6. réteg sávozott megjelenése nem változott a regeneráció során (35. ábra).

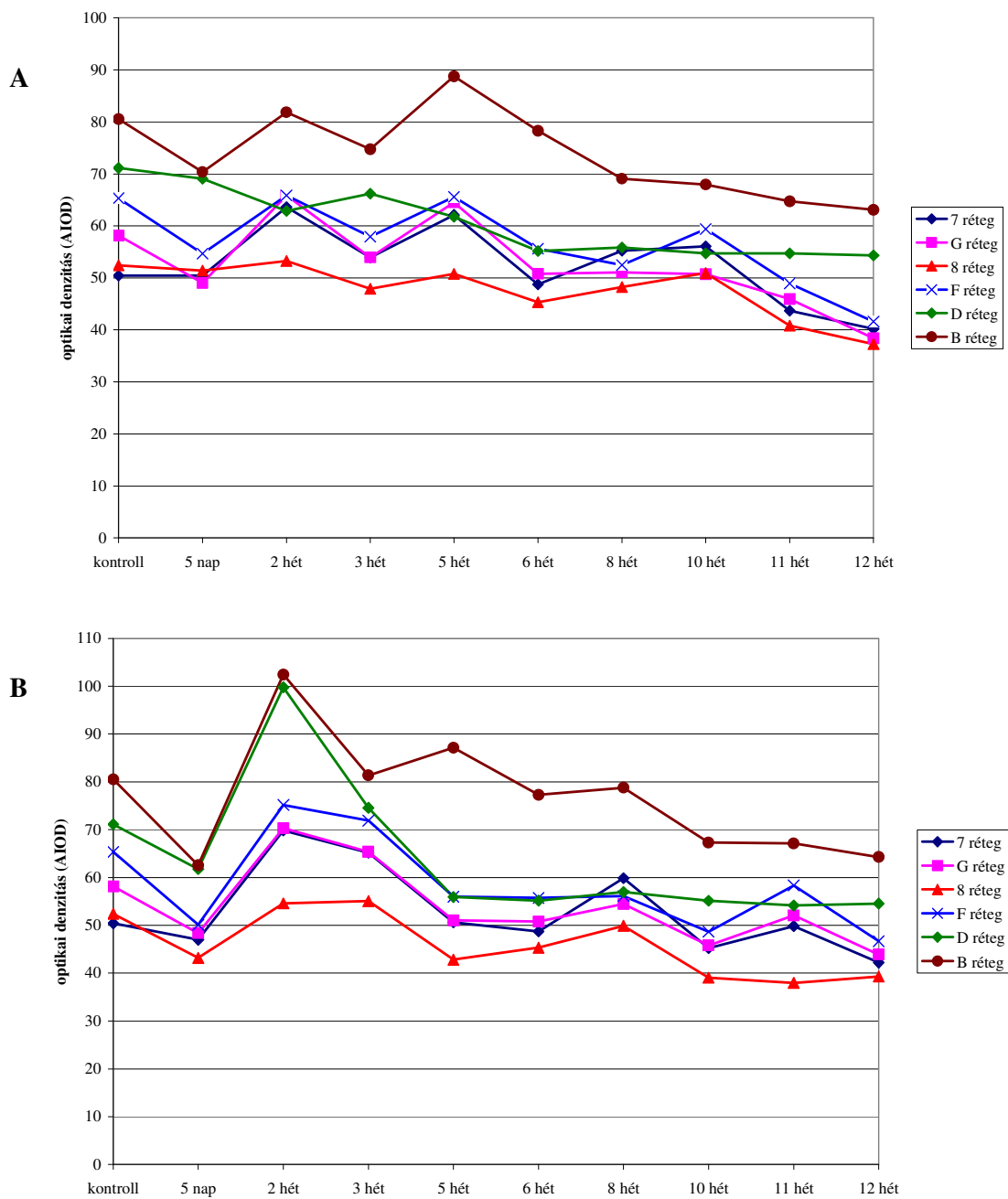
Az optikai denzitás mérések a különböző túlélési időkben a következő változásokat mutatták. Az ötödik túlélési napon a tectum opticum rétegeiben még nem tapasztaltunk eltérést a normál békához képest. A normál békánál megfigyelthez hasonlóan a B, D, F, 5. és 3. rétegben intenzív HA reakció volt látható, gyengébb reakciót tapasztaltunk a G, C, E, 8., 7. és 6. rétegekben, míg nagyon gyenge reakciót az A, 4., 2. és 1. rétegekben (34. A-B ábra).



35. ábra. HA reakció a tectum opticum rétegeiben a mesencephalonban nervus opticus regeneráció során. Minden túlélési stádiumban megfigyelhető volt a PN a 8. és F rétegekben (nyilak). Lépték = 50 μ m.

A második és a harmadik túlélési héten a D réteg mindkét oldalon halványabban festődött, mint a kontroll béka esetében, míg a többi rétegben hasonló intenzitású HA reakció volt látható. A második túlélési héten mindkét oldalon nőtt az optikai denzitás értéke.

Az ötödik túlélési héttől kezdve már nem csak a D, hanem a B és az F rétegben is eltérést tapasztaltunk a normál állathoz képest. A regenerálódó rostokat fogadó oldalon a B, D és az F rétegben a normálnál gyengébb homogén reakciót figyeltünk meg. Ezzel szemben az ép oldalról érkező rostokat fogadó oldalon a reakció mintázata a B, D és F rétegben hasonlított a normál állatban leírthoz, azaz ebben a három rétegben tapasztalható a legintenzívebb festődés. Ez a mintázat volt látható a hatodik-nyolcadik túlélési héten is. A hatodik héten csak az ép oldalon tapasztaltunk nagyobb növekedést és ezután visszaállt a normál békában mért értékekre.



36. A-B ábra. A HA reakció optikai denzitásának (AIOD) időbeni változása a tectum opticumban nervus opticus regeneráció során az ép (A) és az operált (B) oldalon. Az operált oldalon minden rétegben jelentősebben változott az optikai denzitás, mint az ép oldalon. Minden túlélési stádiumban a B rétegben volt a legnagyobb a denzitás mindkét oldalon. A kontroll a nem operált állatnál mért optikai denzitás értékeket jelenti.

A kilencedik túlélési hétre a különbség megszűnt a két oldal között. A tectum opticumban, a B, D, F, 5. és 3. rétegben intenzív HA reakció volt látható, gyengébb reakciót tapasztaltunk a G, C, E, 8., 7. és 6. rétegekben, míg nagyon gyenge volt a reakció az A, 4., 2 és 1 rétegekben (36. A-B ábra).

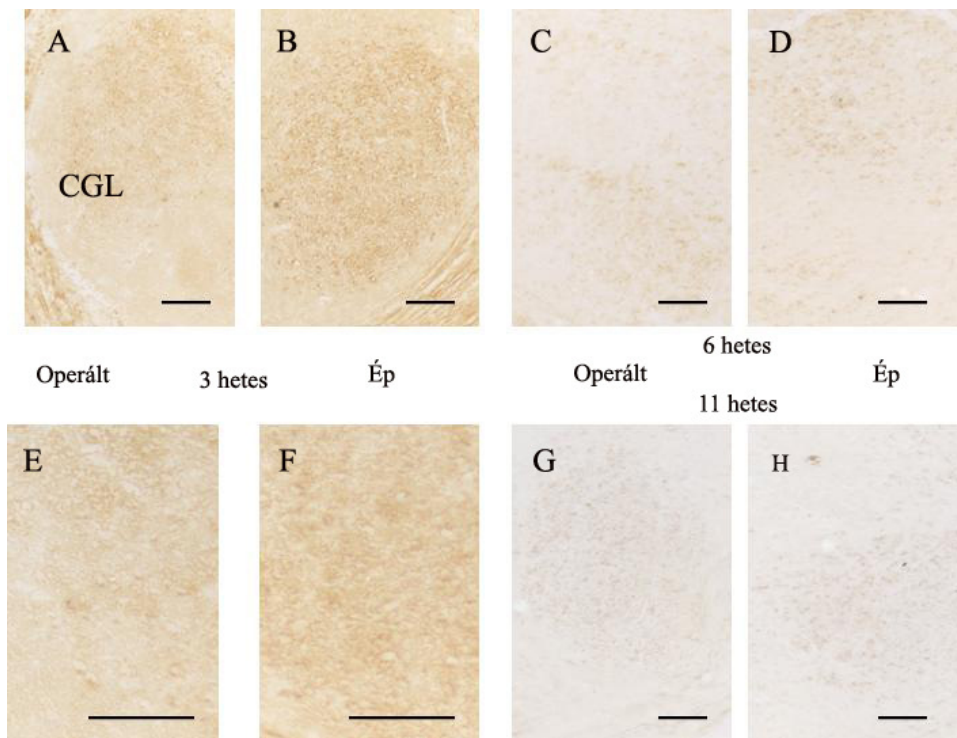
A tizenkettedik túlélési héten az F, a 8. és a G rétegben a reakció intenzitása nagyobb volt, mint az ép oldalon, míg a többi rétegben a kontroll békához hasonló mintázat volt megfigyelhető. A tectum opticumban, a B, D, F, 5. és 3. rétegben intenzív HA reakció volt látható, gyengébb reakciót tapasztaltunk a G, C, E, 8., 7. és 6. rétegekben, míg nagyon gyenge volt a reakció az A, 4., 2. és 1. rétegekben (35. ábra).

A nucleus opticus basalis a normál állathoz hasonlóan egészen az ötödik posztoperatív hétig mindkét oldalon pozitív HA reakciót mutatott. Az ötödik túlélési héttől kezdve a regenerálódó rostokat fogadó oldalon a nucleus opticus basalis nagyon halvány volt, csak az ép rostokat fogadó oldalon volt látható erős HA reakció. A kilencedik túlélési hétre a regenerálódó rostokat fogadó oldalon a nucleus opticus basalis területén újra megjelent egy kevésbé intenzív HA reakció. A tizenkettedik túlélési héten mindkét oldali nucleus opticus basalisban hasonló intenzitásúvá vált a HA reakció.

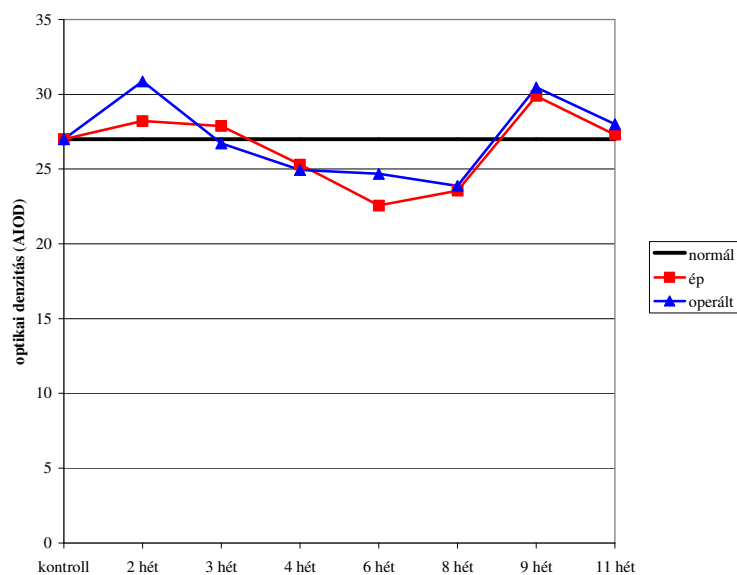
5.4.2. A tenascin-C reakció változása a béka látóközpontjaiban regeneráció során

Nervus opticus regeneráció után a tenascin-C eloszlási mintázatának változását vizsgáltuk a különböző túlélési stádiumokban. A regeneráció során a tenascin-C mintázat kisebb mértékben változott, mint a HA eloszlási mintázata.

Diencephalon A diencephalonban a normál békához hasonlóan minden túlélési stádiumban a corpus geniculatum lateraleban láttunk intenzívebb tenascin-C reakciót (37. ábra). A Bellonci mag területén minden esetben gyengébb tenascin-C reakciót tapasztaltunk. A második túlélési héttől kezdve mindkét oldalon csökkent a tenascin-C reakció intenzitása a CGL-ban, a kilencedik héttől kezdve nőtt és a tizenegyedik hétre megközelítette a nem operált állatban mért értékeket (38. ábra). A második-harmadik túlélési héten az operált oldalon a perineuronális háló dezintegrált lett a regenerálódó rostokat fogadó oldalon (37. ábra).



37. ábra. A tenascin-C reakció a CGL-ban a diencephalonban nervus opticus regeneráció során. A harmadik posztoperatív héten megfigyelhető volt a PN dezintegráltsága. Az E és F ábrán nagyobb nagyítással látható a CGL a harmadik túlélési héten (A, B). Lépték = 50 μ m.



38. ábra. A tenascin-C reakció optikai denzitásának (AIOD) időbeni változása a CGL-ban nervus opticus regeneráció során. Az operált és az ép oldal közötti eltérés nem jelentős egyik túlélési stádiumban sem. A kontroll érték a nem operált állatnál mért optikai denzitást jelenti.

Mesencephalon A mesencephalonban a tectum opticum rétegeiben a normál békához hasonlóan a tenascin-C reakció intenzitása a G, F, 8. és 7. rétegekben volt a legmagasabb és az 1., 2., 3. és 4. rétegekben a legalacsonyabb (39. ábra). A B és a 8. rétegben az operált oldalon jelentős mértékben nőtt az AIOD a harmadik-ötödik posztoperatív hét között, szemben az ép oldallal, ahol nem észleltünk ezekben a rétegekben jelentős változásokat (40. A-B ábra).

Az egyes túlélési stádiumokban mért optikai denzitás értékek analízise azt mutatta, hogy az ötödik túlélési napon a tectum opticum rétegeiben még nem volt eltérés a normál békához képest. A normál békánál megfigyelthez hasonlóan a G, F, 8. és 7. rétegben intenzív tenascin-C reakció volt látható, gyengébb reakciót tapasztaltunk az 5., 6., B, C, D és E rétegekben, míg nagyon gyenge reakciót az 1., 2., 3. és 4. rétegekben (38. A-B ábra).

A második túlélési héten mindkét oldalon halványabban festődött minden réteg, mint a kontroll békánál. A második túlélési héten mindkét oldalon csökkent az optikai denzitás értéke.

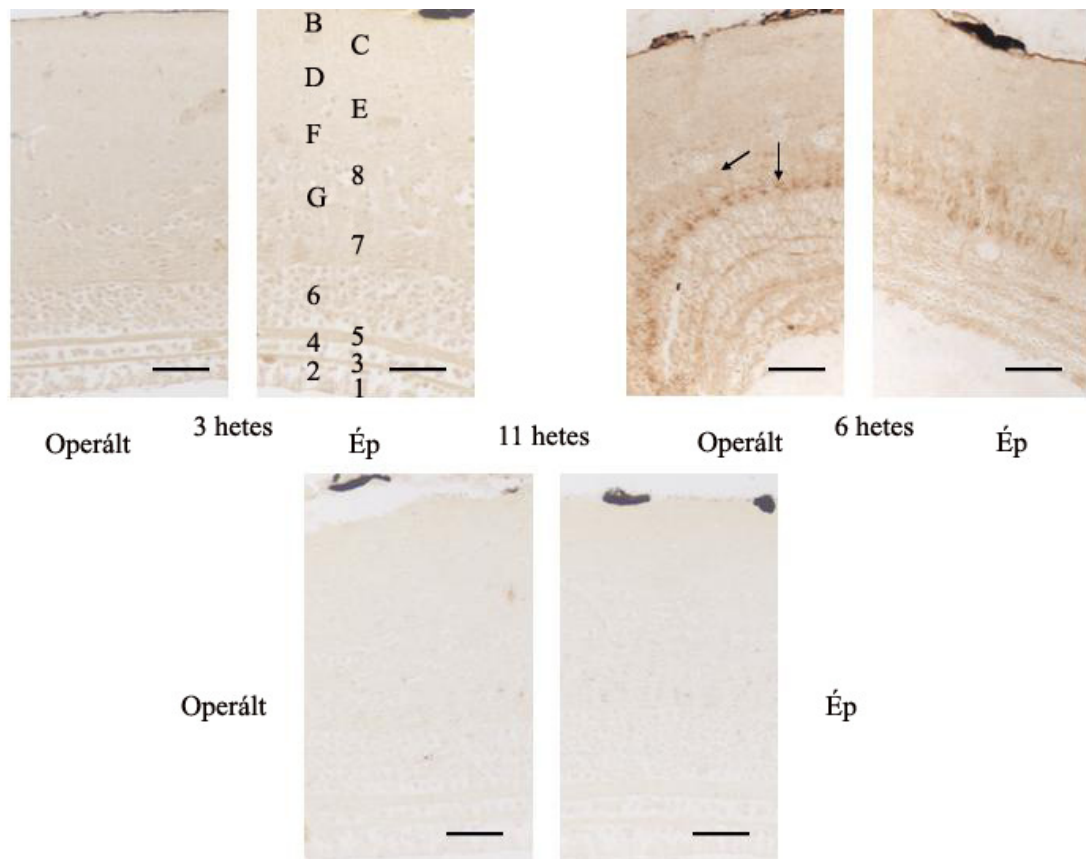
A harmadik-hatodik túlélési héten mindkét oldalon intenzívebb festődést tapasztaltunk minden rétegben, mint a kontroll béka esetében. A regenerálódó oldalon jelentősebb volt a változás, mint az ép oldalon. A perineuronális háló a csak a hatodik héten volt látható jól a 7. és a F rétegekben (37. ábra). Az optikai denzitás maximumát a harmadik-hatodik túlélési hét között érte el, utána mindkét oldalon csökkent.

A hetedik túlélési héttől kezdve mindkét oldalon halvány tenascin-C reakció figyelhetünk meg. A perineuronális hálót ezután nem láttuk a 7. és a F rétegekben (37. ábra). Az optikai denzitás mindkét oldalon csökkent.

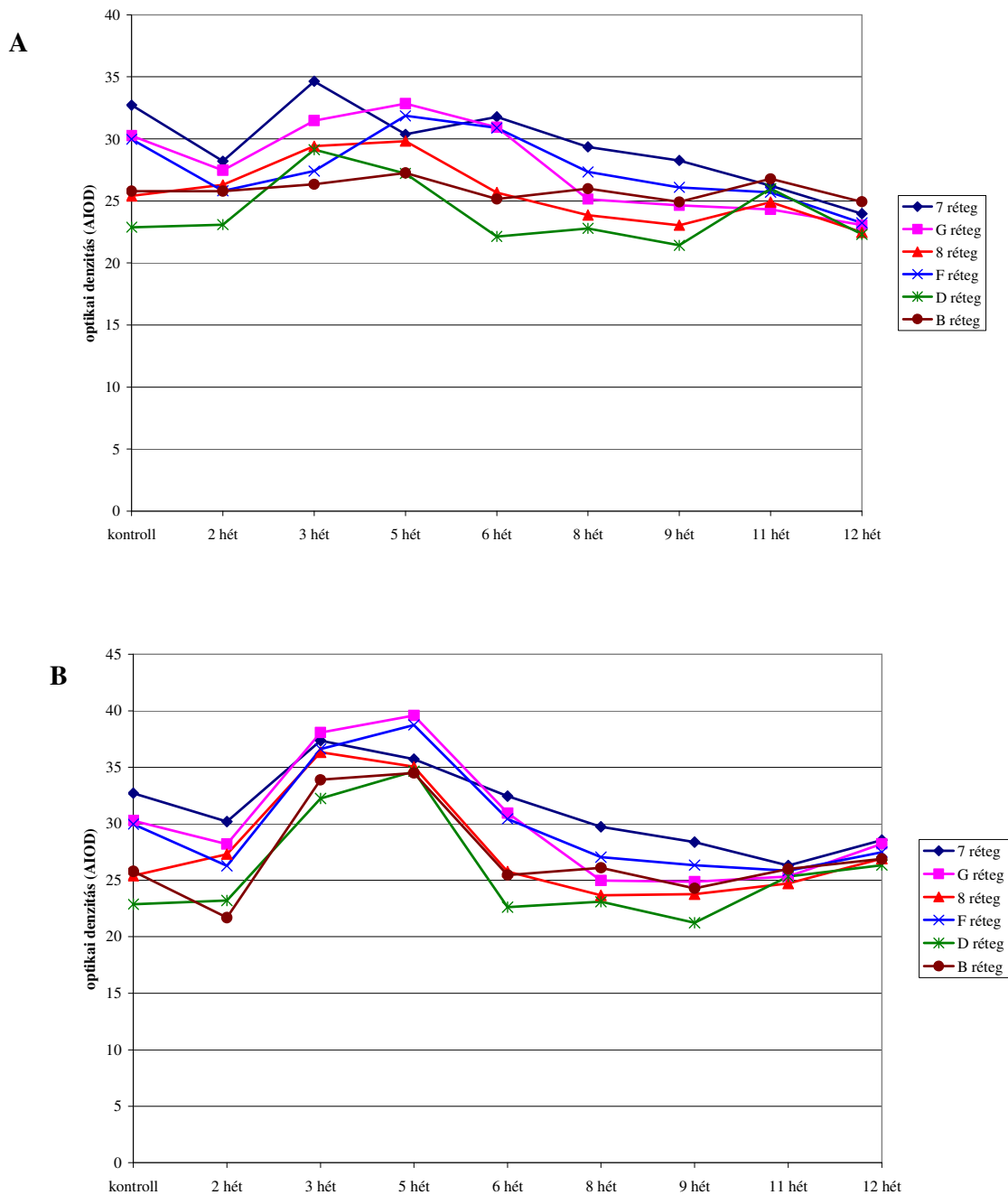
A nyolcadik-kilencedik hét között volt a leghalványabb a tenascin-C reakció a tectum opticum rétegeiben.

A tizenkettedik hétre a tenascin-C reakció optikai denzitása megközelítette a normál állatban mért értékeket mindkét oldalon.

A BON-ban a HA reakciónál leírt változások figyelhetők meg, de a változás kisebb mértékű volt.



37. ábra. A tenascin-C reakció a tectum opticum rétegeiben a mesencephalonban nervus opticus regeneráció során. A festődés intenzitása a hatodik hétre megnőtt, majd utána jelentősen csökkent. A perineuronális háló csak a hatodik posztoperatív héten volt látható a 7 és F rétegekben (nyilak). Lépték = 50 μ m.



38. A-B ábra. A tenascin-C reakció optikai denzitásának (AIOD) időbeni változása a tectum opticumban nervus opticus regeneráció során, az ép (A) és a regenerálódó oldalon (B). Egyik túlélési stádiumban sem tapasztalható jelentős különbség a rétegek optikai denzitása között (A). Minden rétegben az ötödik héten mértük a legnagyobb optikai denzitást az operált oldalon (B). A hatodik-tizenegyedik hét között mindkét oldalon csökkent az AIOD (A, B). Az operált oldalon juelentősebb változások figyelhetők meg, mint az ép oldalon. A kontroll a nem operált békában mért optikai denzitás.

6. MEGBESZÉLÉS

Munkánk első részében vizsgáltuk az ECM makromolekulái közül a HA és a tenascin-C kvantitatív, valamint a HA, a tenascin-C és a fibronectin kvalitatív megoszlását a béka idegrendszerében, specifikus hisztokémiai reakciók alkalmazásával. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a fenti molekulák mind a szürke-, mind a fehérállomány területén egyenlőtlen eloszlást mutatnak. A munka második részében a nervus opticus regeneráció során bekövetkezett HA és a tenascin-C eloszlásváltozást mutattuk ki a nervus opticus diencephalicus és mesencephalicus végződési területein.

6.1. A HA megoszlása a béka központi idegrendszerében

A HA pozitív területek feltérképezése során a **béka** központi idegrendszerében a telencephalonról a gerincvelő caudalis részéig megfigyelhető, hogy ezek a területek nemcsak a látórendszer, hanem a vestibularis rendszer és más központok területén is megtalálhatóak, mind a szürke-, mind a fehérállományban. A telencephalonban a legerősebb reakciót, az amygdala pars medialis és az area preoptica, a bulbus olfactoriusban a stratum granulosum internum és a stratum mitrale mutatta. Ehhez hasonlóan intenzíven festődött a diencephalonban a nucleus Bellonci, a nervus opticus, a chiasma opticum és a tractus opticus, a mesencephalonban a tectum opticum B, D, F, 5. és 3. rétegei, a nucleus isthmi széli része és a belső régió neuropilje. A cerebellumban a Purkinje sejtek rétege, a rhombencephalonban a nucleus cochlearis, nucleus vestibularis lateralisban a PN és a motoros és érző agyidegek átmeneti zónája festődött a legintenzívebben. A gerincvelőben a motoneuronok körüli PN és a radix dorsalis átmeneti zónája mutatott intenzív festődést. Kevésbé intenzíven festődött a diencephalonban a corpus geniculatum laterale perikaryonja körül a PN, a mesencephalonban a tectum opticum G, E, C, 6., 7. és 8. rétegei, a nucleus opticus basalis, a cerebellumban a stratum moleculare és a stratum granulare, a rhombencephalonban a formatio reticularis medialis és median zónája és a gerincvelőben a radix ventralis átmeneti zónája. Halványan festődött a tectum opticum A, 1., 2. és 4. rétege, valamint az agyidegek és gerincvelői gyökök perifériás része.

Az optikai denzitás mérése azt mutatta, hogy a normál béka esetében a diencephalonban a HA reakció optikai denzitása a nucleus Bellonciban volt a legnagyobb. Az optikai denzitás értéke az area preoptican (apo) és a corpus geniculatum lateraleban (CGL) erősebb volt, mint a nucleus preopticus magnocellularisban. A mesencephalonban a tectum opticum rétegei

közül a legmagasabb denzitás a B rétegben, míg a legalacsonyabb az A, 1., 2. és 4. rétegekben volt látható. A HA reakció festődési intenzitásának mérései a nem maszkírozott és a térbelileg hozzáférhető HA-hoz kötődő bHABP mennyiségét tükrözik. A PG molekulák maszkírozó hatása az aggregátokban gazdag szövetekben, mint amilyen a hyalin porc jelentős lehet (Lammi és mtsai., 2001). A maszkírozó hatás a központi idegrendszerben nem valószínű, mivel itt a PG tartalom nagyon alacsony. Erre utal az, hogy a központi idegrendszerben negatív a dimetil metilénké reakció, ami sokkal érzékenyebb reakció a proteoglikán szulfatált GAG-jainak kimutatására (Módis, 1991).

Néhány korábbi kísérletben emlősökben kimutatták a HA lokalizációját a központi idegrendszer különböző részeiben (Margolis és mtsai., 1975; Ripellino és mtsai., 1988; Fryer és mtsai., 1992). Ripellino és munkatársai (1988) kimutatták a HA-t a Purkinje sejtek sejtestjében és a szemcsesejtek citoplazmájában a **fejlődő patkány** kisagyában. A HA megoszlását patkány és emberi agyban is vizsgálták NDOG 1 antitesttel. **Felnőtt patkány agyában** pozitív HA reakció volt látható a kérgi neuronokban, a hippocampusban, a gyrus dentatus granularis sejteiben, a subiculumban, az amygdala basolateralis magjában, a nucleus septalis medialisban, a hypothalamusban, a thalamusban, a colliculus inferior magjaiban, a lemniscus lateralis magjaiban, a nucleus cochlearis ventralisban, a nucleus vestibularisban és az agytörzsi nucleus reticularisában (Yasuhara és mtsai., 1994). **Emberi agyban** a HA reakció pozitív a látókéregben, a hippocampusban, a nucleus reticularis thalamiban, a nucleus ruberben, a substantia nigra pars reticularisában, a kisagykéregben és a nucleus dentatus cerebelliben (Yasuhara és mtsai., 1994). Ennek alapján azt mondhatjuk, hogy bizonyos fokú hasonlóság figyelhető meg a béka, a patkány és az emberi agy HA mintázatában a vestibularis rendszerben és formatio reticularis magjaiban (Yasuhara és mtsai., 1994). A hasonlóság mellett néhány különbség is megfigyelhető a béka tectum opticum, valamint ennek patkányban és emberben megtalálható homológja, a colliculus superior HA mintázata között. A béka tectum opticum HA-ban gazdag, ezzel szemben a patkány és az ember colliculus superiorja nem mutatott pozitív reakciót (Yasuhara és mtsai., 1994). Ezt a különbséget jelenleg nem tudjuk megmagyarázni, valószínűleg összefüggésben lehet azzal, hogy a látóideg emlősökben nem regenerálódik. Bignami és Asher (1992) leírta, hogy a HA hálózatot képez patkányban a myelinizált axonok és a kisgyi szemcsesejtek körül. A HA eloszlását a patkány agyában glialis HA-kötő fehérje (GHAP) segítségével, mint specifikus próbával (Bignami és Asher, 1992; Bignami és mtsai., 1992) vagy NDOG 1 antitesttel (Yasuhara és mtsai., 1994) vizsgálták.

A HA a szürkeállományban elsősorban a perineuronális háló egyik fő elemeként mutatható ki. Irodalmi adatok alapján a HA molekula legalább kétféle kölcsönhatásban vesz részt a perineuronális háló területén. Az egyik esetben, a sejtek HA-receptoraihoz kapcsolódik. A HA-kötő receptorok közül mind a CD44, mind a RHAMM és alternatív splice-variánsaik széles körben expresszálódnak az emlős központi idegrendszerében (Kaaijk és mtsai., 1997; Lynn és mtsai., 2001). A másik lehetőség, a HA molekulák számos lektikán családba tartozó proteoglikánt képesek megkötni, mint az aggregánt, Cat-301-et, versicant és brevicant (Hartmann és Maurer, 2001; Rhodes és Fawcett, 2004). Miután a HA receptorait és a felsorolt PG-ok előfordulását békában még nem vizsgálták, így jelenleg nem tudunk nyilatkozni arról, hogy a két csoport közül mindegyik részt vesz-e a kötődésben.

A HA eredetét a központi idegrendszerben nem pontosan ismerjük. Vannak adatok, amelyek a HA neuronális eredetét írják le (Hartman és Maurer, 2001), mások szerint a hyaluronsavat glia sejtek termelik (Grumet és mtsai., 1985, Asher és Bignami 1991). Előzetes RT-PCR eredményeink alapján, a csirke embrió gerincvelőjében található sejtek tartalmazznak hyaluronsav szintetáz 2 és 3-t (Mészár és mtsai., 2005, személyes közlés).

6.2. A tenascin-C megoszlása a béka központi idegrendszerében

A HA-hoz hasonlóan a tenascin-C is megtalálható a **béka** központi idegrendszerének különböző funkcionális központjaiban, a szürke- és a fehérállományban egyaránt. A diencephalonban a nervus opticus, a chiasma opticum és a tractus opticus, a mesencephalonban a tectum opticum G, E, 8. és 7. rétegei, a nucleus isthmi széli része, a cerebellumban a Purkinje sejtek rétege mutatott intenzív tenascin-C immunreakciót (IR). A rhombencephalonban a nucleus cochlearis és vestibularis lateralisban a PN és a motoros és az érző agyidegek átmeneti zónája, a gerincvelőben a motoneuronok körüli PN és a radix dorsalis átmeneti zónája festődött intenzíven. Kevésbé intenzíven festődtek a telencephalonban az amygdala pars medialis perikaryonja körül a PN, a commissura anterior, a diencephalonban a corpus geniculatum laterale perikaryonja körül a PN, a mesencephalonban a tectum opticum 5., 6., B, C, D és E rétegei, a nucleus opticus basalis. A rhombencephalonban kevésbé intenzíven festődött az oliva superior és a formatio reticularis medialis és median zónája, a gerincvelőben a mellső gyökér átmeneti zónája. Halványan festődött a tectum opticum A, 1., 2., 3. és 4. rétegeiben, a nucleus isthmi neuropilje, a cerebellumban a stratum moleculare és a stratum granulosum, az agyidegek és gerincvelői gyökök perifériás része.

A mi eredményeinkkel szemben felnőtt egérben és csirkében azt tapasztalták, hogy a tenascin-C expressziója alacsony a központi idegrendszerben. A fejlődés korai fázisában ugyan erős tenascin reakció mutatható ki a somatoszenzoros kéregben (Crossin és mtsai., 1989; Steindler és mtsai., 1989), majd ez a tenascin reakció a fejlődés későbbi szakaszában csökken. **Patkányban** felnőtt korban a tenascin-C az idegrendszer azon területein expresszálódik, ahol nagyfokú az idegi plaszticitás, így a hypothalamus magjaiban és a szagló rendszerben (González és Silver, 1994, Theodosia és mtsai., 1997). Ezzel összhangban van az a megfigyelésünk, hogy a felnőtt **békában** közepesen intenzív tenascin-C reakciót láttunk a bulbus olfactoriusban. A cerebellumban csak a Purkinje sejtek körül mutattak ki **felnőtt egérben** tenascin reakciót Bartsch és munkatársai (1992b), ehhez hasonlóan a békában is a Purkinje sejtek körül volt a legerősebb reakció. **Normál egér** (Bartsch és mtsai., 1992a) és **patkány** nervus opticusban (Ajemian és mtsai., 1994) nem expresszálódik a tenascin-C, szemben a **békával**, ahol normál állatban is tapasztalható tenascin-C reakció, ami összefügghet a nervus opticus regenerációs képességével a kétélűekben.

6.3. A fibronectin eloszlása béka központi idegrendszerében

Vizsgálatainkban a fibronectin reakció a béka agy és a gerincvelő szürke- és fehérállományában több helyen pozitív volt. A szürkeállományban a neuropil és a neuronok citoplazmája festődött, a PN nem. A telencephalonban a legintenzívebben festődött a bulbus olfactorius accessorius, a commissura anterior és pallii, a diencephalonban pedig a nervus opticus, a chiasma opticum és a tractus opticus. A cerebellumban a Purkinje sejtek, a rhombencephalonban a nervus trigeminus motoneuronjainak citoplazmája és a motoros és érző agyidegek átmeneti zónája, a gerincvelőben a commissura anterior, a motoneuronok és a radix dorsalis átmeneti zónája mutatott intenzív fibronectin immunreakciót (IR). A mesencephalonban közepesen intenzíven festődött a nucleus isthmi széli része és neuropilje, míg halványan a nucleus opticus basalis.

A fibronectin fontos szerepet játszik a neurális adhézcióban, segít az axonok növekedésében a fejlődés során, pl.: a nagyagy kérgi sejtek esetében (Chun és Shatz, 1988). A felnőtt **patkányok** corpus callosuma nagy mennyiségben tartalmaz astrocytához kapcsolódó fibronectint (Tom és mtsai., 2004), a **béka** telencephalonjának commissuralis pályái (commissura pallii, commissura anterior) is erősen pozitívak voltak. Anti-fibronectin kezelés hatására a corpus callosumban található astrocyták morfológiája megváltozik. A fibronectin jelentős expressziója a fehérállományban hozzájárulhat ahhoz, hogy felnőtt központi

idegrendszerben az axon nem képes regenerációra (Tom és mtsai., 2004). Tom és munkatársai (2004) megfigyelték, hogy az érző neuronok erőteljesen növekedtek a fehérállományt tartalmazó szeleten, míg a felnőtt állatból származó kérgi neuronok rosszul növekedtek ugyanezek a szeleteken. Ennek egyik oka az lehet, hogy a kétféle neuron nem azonos kötőhelyek révén kapcsolódik a fibronectinhez.

A fibronectinről ismert, hogy a glia termeli (Sheppard és mtsai., 1995; Stettler és Galileo, 2004), ezzel szemben saját vizsgálatainkban a fibronectint a neuronok citoplazmájában mutattuk ki. Ennek okát jelenleg nem ismerjük. Lehetséges, hogy békában nem csak gliasejtek, hanem neuronok is képesek lehetnek a fibronectin termelésére. Ennek eldöntésére a mRNS *in situ* hibridizációval történő kimutatása szükséges.

6.4. A HA, tenascin-C és fibronectin eloszlási mintázatának összehasonlítása a béka idegrendszerében

Vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a HA, tenascin-C és a fibronectin egyenlőtlen eloszlást mutat a béka központi idegrendszerében. Hasonló vizsgálatok korábban a béka és más alacsonyabbrendű gerinces idegrendszerében nem történtek és magasabbrendű gerincesekben is nagyon kevés adat áll rendelkezésre az ECM makromolekulák központi idegrendszeri eloszlási mintázatáról (Yasuhara és mtsai., 1994). Mindhárom molekulát kimutattuk a szürke- és fehérállomány területén, de egyik esetben sem találtunk olyan megoszlást, amely kizárólagosan köthető lenne valamilyen specifikus struktúrához. A szürkeállományban mindhárom molekula jelen volt a neuropilben. A legfontosabb különbség a fibronectin és a másik két reakció között az, hogy a tenascin-C-t és a HA-t a perikaryon körüli PN-ban és a dendritekben találtuk meg, míg a fibronectint a neuron citoplazmájában. A HA és a tenascin-C eloszlásban tapasztalható hasonlóságok egyik oka az lehet, hogy a PN-ben a HA tenascinhoz kötve fordul elő (Fox és Caterson, 2002). Az alábbiakban az egyes agyterületeken mutatkozott legjelentősebb hasonlóságokat és különbségeket foglaltuk össze.

Telencephalon A bulbus olfactorius accessorius erősen festődött fibronectinre, míg a másik két esetben jóval gyengébb volt. A bulbus olfactoriusban a stratum granulosum internum és a stratum mitrale intenzív HA reakciót mutatott. A tenascin-C esetében az előbb leírt két rétegben és a stratum glomerulareban egyformán közepesen intenzív homogén a reakció, de a PN egyik reakció esetében sem volt megfigyelhető. A stratum mitrale sejtjei intenzív fibronectin reakciót mutattak. Az area preoptica nagysejtes régiója pozitív HA reakciót

mutatott, a sejtestek és a proximalis dendritek körül jól látható volt a PN, a tenascin-C és a fibronectin esetében ez a terület gyengén festődött.

A palliumban csak a HA esetében volt látható erős festődés, a tenascin-C és fibronectin IR gyenge festődést mutatott. Tenascin-C reakciónál csak a commissura anterior, míg a fibronectin reakciónál a commissura anterior és a commissura pallii festődött, a pozitív és negatív területek sávos mintázatot mutattak, míg a terület HA-ra alig festődött. A lateralis előagyú kötegben mindhárom reakciónál halvány festődést tapasztaltunk.

Diencephalon A nucleus Bellonciban a HA reakció esetén láttunk erős pozitívítást, az erősen festődő neuropilben nehezen volt felismerhető a perineuronális háló. A tenascin-C és a fibronectin reakciónál közepesen intenzív inhomogén festődést tapasztaltunk. A corpus geniculatum laterale mindhárom esetben pozitív volt, jól elkülöníthető perineuronális hálóval a HA és a tenascin-C reakció esetében.

A habenula dorsalis csak a HA esetében mutatott nagyon intenzív reakciót, míg a habenula ventralis nagyon gyengén festődött mindhárom reakcióval. A hypothalamus subependymalis és subpialis régiójában erős HA pozitívítás volt látható, a másik két reakciónál halvány festődést tapasztaltunk. Mindhárom esetben erős reakciót láttunk a nervus opticusban, a chiasma opticumban és a tractus opticusban.

Mesencephalon A tectum opticumban a HA és a tenascin-C reakció intenzitásának erőssége több helyen átfedést mutatott. Intenzív HA reakció volt látható a B, D, F, 5. és 3. rétegben, gyengébb reakciót tapasztaltunk a G, C, E, 8, 7. és 6. rétegekben, míg nagyon gyenge a reakciót az A, 1., 2. és 4. rétegekben. Az F és 8 rétegben jól felismerhető volt az intenzíven festődő perineuronális háló. A tenascin-C immunreakció a G, F, 8. és a 7. rétegekben volt erősebb, gyengébb reakciót tapasztaltunk az 5., 6., B, C, D és E rétegekben, míg nagyon gyenge volt a reakció az A, 1., 2., 3. és 4. rétegekben. A PN jól látható volt a 7. és F rétegekben. Az előbb felsorolt rétegek közül a kontralateralis opticus rostok végződési területén mindkét reakció erősebb volt az F és G rétegekben, míg a B és D rétegekben a HA volt jóval intenzívebb. Ezen belül az F rétegben jól látható volt a PN. A primer afferensek opticus rostokat fogadó tectalis rétegekben észlelt intenzív HA és tenascin-C reakció arra utalhat, hogy ezeknek a molekuláknak fontos szerepe lehet a nervus opticus regenerációja során fellépő plasztikus változásokban. Azok közül a rétegek közül, amelyek nem fogadnak primer afferens opticus rostokat, mind a tenascin-C, mind a HA reakció intenzív volt a 7. és 8. rétegben és a PN is jól felismerhető volt. A két réteg közül a 8. réteg a nucleus isthmivel van kapcsolatban. Feltételezhető, hogy a nervus opticus átvágása után az isthmotectalis kapcsolatok működése is megváltozik, és a változáshoz vezető jelátviteli folyamatokban

fontos lehet a tenascin-C és a HA szerepe. A tectum opticum rétegeiben a fibronectin reakciónál nem tapasztaltunk jelentős eltérést az egyes rétegek festődésében.

A tegmentum mesencephaliban a szürkeállomány a HA és a tenascin-C reakciónál erősen, míg a fibronectin reakciónál közepesen intenzíven festődött a torus semicircularis subependymalis, principalis, magnocellularis, laminaris és commissuralis magjaiban. Ezzel szemben a nuclei anterodorsalis és anteroventralis tegmenti mindegyik reakciónál gyengén festődött. A HA és tenascin-C esetében egyaránt intenzív reakciót láttunk a nucleus nervi oculomotorii és nucleus nervi trochlearis területén, a sejteket körülvevő perineuronális hálóban. Az idegrendszer számos területén kimutatták, hogy azok a neuronok, amelyek körül erőteljes PN található, kevésbé sérülékenyek a különböző betegségekben (Alzheimer, Parkinson kór, Brückner és mtsai., 1999). A szemmozgató agyidegi magok körüli igen intenzív HA és tenascin-C reakció összefüggésben lehet azzal, hogy ezek a neuronok nem, vagy csak minimálisan károsodnak olyan betegségekben, amelyek a somatomotoros neuronokat érintik (pl. amyotrophiás laterosclerosis, Przedborski és mtsai., 2003).

A BON a HA és a tenascin-C esetében erősen, míg fibronectinnel halványan festődött. A nucleus isthmi széli része csak a fibronectin esetében festődött halványan. A neuropilben csak a HA reakciónál tapasztaltunk intenzív reakciót.

Cerebellum A HA és a tenascin-C reakció a kisagy minden rétegében detektálható volt, a stratum granulosumban a HA, a stratum ganglionareban a tenascin-C festődött a legerősebben. A fibronectin reakció is jól látható volt a kisagy minden rétegében. A legerősebb festődést a Purkinje sejtek rétegében, a sejtek citoplazmájában tapasztaltuk.

Rhombencephalon A HA és a tenascin-C esetében minden motoros agyidegi mag erős reakciót mutatott, ami a motoneuronok körüli perineuronális háló fejlődésének köszönhető, ami azonban nem olyan intenzív, mint a mesencephalonban található szemmozgató agyidegi magvakban. Az érző agyidegek magjai, mint a nucleus cochlearis és a nucleus vestibularis lateralis (Deiters mag) körül is pozitív HA és tenascin-C reakciót figyeltünk meg, különösen erős a Deiters mag körül. A fibronectinnél a motoneuronokban pozitív reakciót figyeltünk meg.

A formatio reticularisban, a kissejtes periventricularis szürkeállomány az egész rhombencephalon területén gyengén festődött mindhárom reakció esetében. A formatio reticularis medialis és median zónájában a HA és a tenascin-C reakció közepes intenzitású, a nagy sejtek körül nagyon intenzíven festődő perineuronális háló volt látható. A kissejtes és a nagysejtes periventricularis szürkeállományban a neuronok festődtek fibronectin reakciónál.

Az oliva superiorban pozitív reakció volt látható mindhárom esetben. A rhombencephalon fehérállományában a legerősebben az érző rostokat tartalmazó tractus spinalis nervi trigemini, a tractus nervi vestibulocochlearis és a felszálló gerincvelői kötegek festődtek mindhárom reakció esetében. A tractus solitarius és a fehérállomány subependymalis része gyengén festődött.

Mindhárom ECM molekula esetében nagyon erős reakciót tapasztaltunk a motoros és érző agyidegek neuraxisba történő belépésénél, az átmeneti zónában. Gyenge HA és tenascin-C reakció volt látható az idegek perifériás részen, míg erős volt a reakció fibronektinre.

Gerincvelő Mindegyik reakciót detektáltuk a gerincvelő szürke- és fehérállományában. A mellső szarvban nagyon intenzíven festődő perineuronális háló volt látható a motoneuronok perikaryonja, és a proximalis dendritjei körül a HA és a tenascin-C reakciónál. Fibronektin reakciónál a motoneuronok citoplazmája mutatott pozitívítást. A commissura anterior rostjai erősen festődtek HA és tenascin-C reakcióval. A fehérállományban a legerősebb reakciót a funiculus lateralis subpialis területén láthattuk. A radix dorsalis átmeneti zónája nagyon intenzíven festődött mindhárom reakciónál, míg a radix ventralis átmeneti zónájában kisebb intenzitású reakciót tapasztaltunk, mint a radix dorsalisnál és maga a radix ventralis és dorsalis nagyon gyenge HA és tenascin-C reakciót mutatott, de erősen festődött fibronektinre.

6.5. Nervus opticus regenerációs vizsgálatok

6.5.1. A HA reakció változása a béka látóközpontjaiban regeneráció során

Diencephalon Általánosságban elmondható, hogy az ötödik túlélési naptól kezdve mindkét oldalon mind a nucleus Bellonciban (nB), mind a corpus geniculatum lateraleban (CGL) csökkent a HA reakció intenzitása. A CGL-ban a harmadik posztoperatív hétig az ép oldalról érkező rostokat fogadó oldalon a csökkenés kisebb mértékű volt, mint a regenerálódó rostokat fogadó oldalon. A harmadik hét után a regenerálódó oldalon nagyobb mértékű volt az optikai denzitás növekedése, mint az ép oldalon. A nB-ban a CGL-hoz hasonlóan a harmadik posztoperatív hétig az ép oldalról érkező rostokat fogadó oldalon a csökkenés kisebb mértékű volt, mint a regenerálódó rostokat fogadó oldalon. A harmadik hét után a regenerálódó oldalon nagyobb mértékű volt az optikai denzitás növekedése, mint az ép oldalon. A nucleus Bellonciban a reakció intenzitása kisebb mértékben változott, mint a corpus geniculatum lateraleban, ez a különbség mind az ép, mind a vágott oldalon megfigyelhető volt.

A PN dezintegrálódása az operált oldalon a corpus geniculatum lateraleban a második posztoperatív héten kezdődött és az ötödik posztoperatív hétig megfigyelhető volt. Ettől

kezdvé a corpus geniculatum laterale területén mindkét oldalon a PN dezintegráltsága megszűnt. A PN dezintegráltsága és a HA reakció csökkenése fontos lehet az új szinaptikus kapcsolatok kialakulása szempontjából, melyeket a reintegrálódó PN stabilizálhat (Hockfield és McKay, 1983; Celio és mtsai., 1998). A corpus geniculatum lateraleban tapasztalt dezintegráltság a második-ötödik hét között volt megfigyelhető az operált oldalon ez átfedi a Stelzner és munkatársai (1981) által leírt harmadik-negyedik posztoperatív hetet, amikor a regenerálódó nervus opticus rostok elérték a diencephalon.

Mesencephalon Az optikai denzitás mérések a különböző túlélési stádiumokban a következő változásokat mutatták. Az ötödik túlélési napon nem tapasztaltunk változást a normál békához képest. A második és a harmadik túlélési héten a D réteg mindkét oldalon halványabban festődött, mint a kontroll béka esetében, ebben az időszakban tapasztaltunk változást a CGL-ben is. A többi rétegben hasonló intenzitású HA reakció volt látható. Az ötödik túlélési héttől kezdve már nem csak a D, hanem a B és az F rétegben is eltérést tapasztaltunk. A regenerálódó rostokat fogadó oldalon a B, D és az F rétegben homogén reakció volt megfigyelhető, nem volt eltérés köztük. Az F és 8. rétegekben minden túlélési stádiumban láttunk PN-t, szemben a tenascin-C reakcióval, ahol csak a hatodik posztoperatív héten láttunk PN-t a 7. és F rétegekben.

Az ötödik posztoperatív hétig a nucleus opticus basalis mindkét oldalon pozitív volt. Az ötödik posztoperatív héten a regenerálódó rostokat fogadó oldalon halvány HA reakciót tapasztaltunk, csak a kilencedik hét után jelent meg újra erős pozitív HA reakció.

Az irodalmi adatok alapján ismert, hogy a béka nervus opticus regenerációra képes, ismert, hogy a regenerálódó rostok milyen sorrendben és mennyi idő alatt érik el a diencephalonban és a mesencephalonban megtalálható targetjeiket (Stelzner és mtsai., 1981). A tectum opticumban és a BON-ban tapasztalt reakció intenzitás csökkenés az ötödik-nyolcadik hétre tehető, ez egybe esik a Stelzner és munkatársai (1981) megfigyeléseivel, hogy a regenerálódó opticus rostok a nyolcadik hétre elérik mesencephalicus központjaikat. Kimutattuk, hogy azokban a rétegekben jóval erősebb HA reakció intenzitása, ahol cobalt-lysin jelöléssel a primer opticus rostok végződéseinek nagy részét megtalálták (Lázár, 1978). A HA szerepe az idegi regenerációban még nem pontosan ismert, serkentő szerepét írták le patkány környéki idegrendszerében (Seckel et al., 1995; Wang et al., 1998; Ozgenel, 2003), más szerzők gátló szerepét írták le a sejt és a rost migráció során a központi idegrendszerben (Rhodes és Fawcett, 2004). Hatását befolyásolhatja molekulatömege, mivel az eltérő molekulatömegű variánsainak eltérő szerepe lehet a regenerációban (Toole, 1982). A HA a

hozzá kapcsolódó proteoglikánok (Yamagata és mtsai., 1986) és sejtfelszíni receptorai révén (Entwistle és mtsai., 1996) különböző jelátviteli folyamatokban vehet részt, melyek tovább módosíthatják permisszív ill. non-permisszív szerepét.

6.5.2. A tenascin-C reakció változása a béka látóközpontjaiban regeneráció során

Diencephalon. A nucleus Bellonci területén minden esetben gyenge tenascin-C reakciót tapasztaltunk. A második-harmadik túlélési héten az operált oldalon a perineuronális háló dezintegrált lett a corpus geniculatum lateraleban a regenerálódó rostokat fogadó oldalon, szemben az ép oldallal majd a negyedik túlélési hétre állt helyre a PN integritása. A második túlélési héttől kezdve a corpus geniculatum lateraleban mindkét oldalon csökkent a tenascin-C reakció intenzitása. A kilencedik héttől kezdve nőtt a tenascin-C reakció optikai denzitása és a tizenegyedik hétre megközelítette a nem operált állatban mért értékeket.

Mesencephalon. A mesencephalonban a tectum opticum rétegeiben a normál békához hasonlóan a tenascin-C reakció intenzitása a G, F, 8. és 7. rétegekben volt a legmagasabb és az A, 1., 2., 3. és 4. rétegekben a legalacsonyabb. A B és a 8. rétegben az operált oldalon jelentős mértékben nőtt az AIOD a harmadik-ötödik túlélési hét között, szemben az ép oldallal, ahol nem észleltünk ezekben a rétegekben jelentős változásokat.

A második hétig csökkent a tenascin-C immunreakció (IR). Mindkét oldalon halványabban festődött minden réteg, mint a kontroll békánál, és ezt mutatta az optikai denzitás mérése is. A harmadik-hatodik túlélési héten mindkét oldalon intenzívebb festődést tapasztaltunk minden rétegben, mint a kontroll béka esetében. A perineuronális háló a csak a hatodik héten volt jól látható a 7. és a F rétegekben. Az optikai denzitás maximumát a harmadik-hatodik túlélési hét között érte el, utána mindkét oldalon csökkent. Az optikai denzitás minimumát a nyolcadik-kilencedik hét között érte el. A tizenkettedik hétre a tenascin-C reakció optikai denzitása megközelítette a normál állatban mért értékeket mindkét oldalon.

A BON-ban a HA reakciónál leírt változások figyelhetők meg, de a változás kisebb mértékű volt.

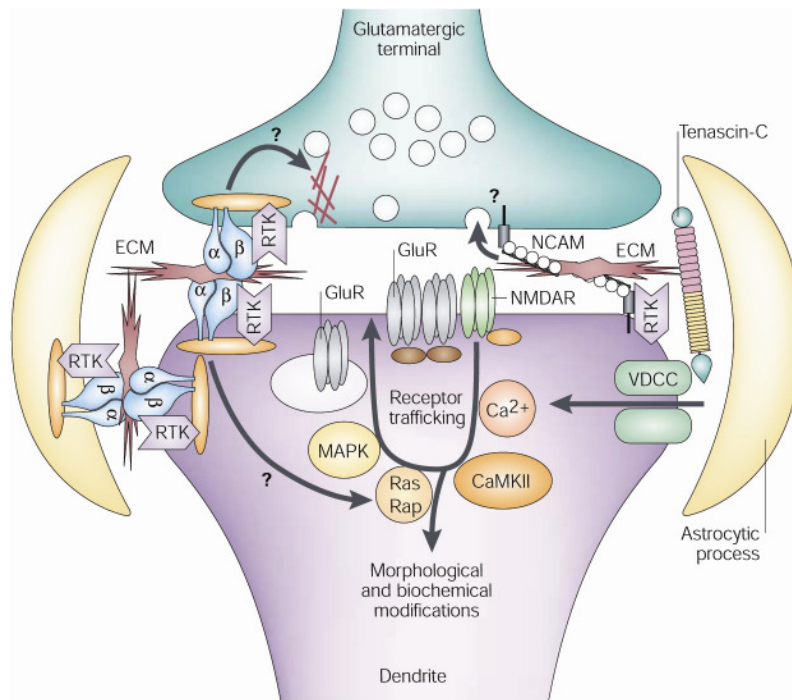
A HA reakcióhoz hasonlóan a második-harmadik túlélési héten a PN dezintegráltsága a CGL-ben tenascin-C reakciónál is megfigyelhető. A regeneráció során új szinapszisok alakulhatnak ki melyeket a reintegrálódó PN stabilizálhat. A tectum opticumban mindkét reakció esetében kisebb mértékű volt a változás, mint a diencephalonban.

Patkány nervus opticusának átvágása után egy nappal, az átvágás utáni harmadik hétig tenascin reakciót figyeltek meg az átvágás helyén, az idegszövet és a leptomeningealis sejtek közötti határfelületen (Ajemian és mtsai.,1994). Később patkánynál a sérült ideg mellett elhelyezkedő leptomeninx sejtek és néhány astrocyta mutatott tenascin reakciót. A béka esetében is csak a túlélési idő egy periódusában, a harmadik-hatodik hét között növekedett a tenascin-C reakció intenzitása, mely nem esik egybe patkánynál tapasztalttal.

Irodalmi adatok szerint a tenascin-C fontos szerepet játszik a központi és környéki idegrendszerben bekövetkezett sérülések utáni ideg regenerációban, azonban pontos szerepe még nem tisztázott. Becker és munkatársai (1995) két kétéltűben, a *Discoglossus pictus*-ban (korongnyelvű béka) és a *Pleurodeles waltl*-ban (bordás göte) vizsgálták a regenerálódó retinotectalis rendszerében a tenascin- C expresszióját. Vizsgálataik azt mutatták, hogy a tectumban a 28. napon eltűnt a tenascin-C IR, míg csak a békában találtak pozitív immunreakciót hasonlóan az általunk tapasztaltakhoz. A mesencephalonban a tectum opticum felszíni rétegeiben, melyekben az opticus rostok végződnek gyenge immunreakciót tapasztaltak és ezt erősítik meg a mi eredményeink is. A kétéltűekben a magasabbrendű gerincesekkel szemben fejlődés során nem csökken az agy különböző területein a tenascin-C reakció intenzitása (Becker és mtsai., 1995), ez egy pedomorfizmus. Mivel a tenascin-C is részt vesz az ideg regenerációban (Bastmeyer és mtsai., 1990; Martini és mtsai., 1990; Becker és mtsai., 1995), és ez a pedomorfizmus lehet az egyik lehetséges magyarázata annak, hogy a kétéltűekben a nervus opticus regenerálódik.

6.6. A HA és a tenascin-C lehetséges szerepe a nervus opticus regenerációjában

Kísérleteink eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy a nervus opticus regenerációja során mind a hyaluronsav, mind a tenascin-C eloszlása változik a diencephalicus és mesencephalicus látóközpontokban. Az eloszlási mintázat és a reakció intenzitásának változása alapján nem vonhatunk le egyértelmű következtetéseket arra vonatkozóan, hogy a HA és a tenascin-C permisszív vagy non-permisszív szerepet játszik-e a nervus opticus regenerációjában. Az ECM molekulák hatását számos körülmény befolyásolhatja: a HA esetében a molekula tömege, a tenascin C esetében pedig a különböző splice variánsok expressziója. Fontos szerepe lehet annak, hogy milyen receptorokhoz kötődik a HA vagy a tenascin C, és az extracellularis térben milyen enzimatisz degradáció történik.



39. ábra. Az ECM makromolekulák lehetséges szerepe a szinapszisok plaszticitásának szabályozásában (Dityatev és Schachner, 2003). Az ECM molekulák sejt felszíni receptorai (integrinek- α , β) és a neurális sejtadhéziós molekula (NCAM) jelátviteli komplexet képez a tirozin kináz receptorral (RTK) a pre- és poszt szinaptikus végződéseken. Az ECM molekulák összekötik a pre- és poszt szinaptikus molekuláris komplexeket, melyek a citoszkeletonra, a receptorokra és vezikula felszabadulásra hatnak. Az ECM újraszerveződését a kalcium szintje szabályozza a feszültség függő Ca csatorna (VDCC) vagy a Ras és Rap révén. CaMKII- kalcium/calmodulin dependens protein kináz II; GluR-az AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol propionsav) glutamát receptor; MAPK-mitogén aktivált protein kináz; NMDAR-N-metil-n-aszpartát receptor.

Az ECM-nek az idegrendszerben betöltött szerepéről egyre inkább körvonalazódik az a hipotézis, az ECM makromolekulái a szinaptikus részben egy jelátviteli komplex kialakításában vesznek részt. Ebben a komplexben az ECM makromolekulái a pre- és poszt szinaptikus membránban található receptoraihoz, CAM-okhoz, ioncsatornákhöz, neurotransmitter receptorokhoz, valamint a receptor tirozin kinázhoz (TRK) kötődnek és ezáltal alkalmasak lehetnek a pre- és poszt szinaptikus történések koordinálására (39. ábra). A jelátviteli komplex a citoszkeleton közvetítésével befolyásolhatja a neurotransmitter release-t, a génexpresszió megváltoztatásán keresztül pedig módosíthatja a különböző sejt funkciókat (Dityatev és Schachner, 2003). Mindezen folyamatok eredményeként az ECM különböző makromolekulái permisszív vagy non-permisszív szerepet játszhatnak az idegi regenerációban

és plaszticitásában. Az idegi sérüléskor a sejtek deafferentálódása a jelátviteli komplex megváltozását vonhatja maga után, ami olyan intracellularis folyamatokat indíthat el, aminek következtében megváltozik a neuronokat körülvevő ECM összetétele. A különböző életkorban és fajokban megfigyelhető regenerációs potenciál hátterében az ECM eltérő eloszlása állhat.

7. ÖSSZEFOGLALÁS, EREDMÉNYEK JELENTŐSÉGE

Jelen munkánk során első részében tanulmányoztuk a béka központi idegrendszerében az extracellularis matrix (ECM) molekulák közül a hyaluronsav, tenascin-C és fibronectin megoszlását specifikus hisztokémiai reakciók segítségével. Megállapítottuk, hogy a telencephalonban, diencephalonban, mesencephalonban, cerebellumban, rhombencephalonban és gerincvelőben mindhárom molekula pozitív reakciót adott a szürke- és fehérállományban, de egyik esetben sem találtunk olyan megoszlást, amely kizárólagosan köthető lenne valamilyen specifikus struktúrához. A szürkeállományban a legfontosabb különbség az volt, hogy a tenascin-C-t és a HA-t a perikaryon körüli perineuronális hálóban (PN) találtuk meg, míg a fibronectint a neuron cytoplazmájában. A neuropil mindhárom reakció esetében pozitív volt. A HA és a tenascin-C eloszlásban tapasztalható hasonlóságok egyik oka az lehet, hogy a PN-ban a HA a tenascinhoz kötve fordul elő. A nervus opticus végződési területein a HA és a tenascin-C reakció intenzitásbeli különbségeit optikai denzitás méréssel is igazoltuk.

A munka második részében a nervus opticus átvágása után vizsgáltuk a HA és a tenascin-C reakció intenzitásában bekövetkező változásokat regeneráció során. Az ötödik túlélési naptól kezdve mindkét oldali nucleus Bellonciban (nB) és corpus geniculatum lateraleban (CGL) csökkent a reakció intenzitása. A harmadik posztoperatív hétig mindkét magban kisebb mértékű volt a csökkenés az ép nervus opticus rostjait fogadó oldalon. A harmadik héttől kezdve nőtt az optikai denzitás mindkét oldalon, és ez a növekedés nagyobb mértékű volt a regenerálódó rostokat fogadó oldalon. Valamennyi vizsgált stádiumban a nB területén a reakció intenzitása kisebb mértékben változott, mint a CGL-ban, és ez a különbség mindkét oldalon megfigyelhető volt. Mindkét reakció esetében a második-negyedik túlélési hét között a PN dezintegráltságát tapasztaltuk a corpus geniculatum lateraleban a regenerálódó rostokat fogadó oldalon, majd a PN dezintegráltsága az ötödik héten megszűnt. Ez a lelet arra utal, hogy a HA és a tenascin-C csökkenése szükséges a regeneráció megindulásához. Az intenzitás későbbi növekedése arra utal, hogy az szinaptikus kapcsolatokat a reintegrálódó PN és a reexpresszálódó HA és tenascin-C stabilizálhatja. A mesencephalonban a tectum opticum rétegeiben kisebb mértékű volt a változás, mint a diencephalicus látóközpontokban. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a nervus opticus regenerációját a HA és a tenascin-C kvalitatív és kvantitatív változása kíséri a béka látóközpontjában.

8. The role of the extracellular matrix molecules in the optic nerve regeneration of frog

Zsuzsa Máthéné Szigeti, Department of Anatomy, Histology and Embriology

University of Debrecen, Medical and Health Science Center, Hungary

SUMMARY

In the first part of our study we observed, with the aid of specific histochemical reactions, the distribution pattern of hyaluronan (HA), tenascin C and fibronectin, extracellular matrix (ECM) molecules in the central nervous system of the frog. We obtained that all of the three molecules were present in the gray and white matter in telencephalon, diencephalon, mesencephalon, cerebellum, rhombencephalon and spinal cord, but we did not find any distribution that can be connected to specific structures. In the gray matter the most important difference was that the HA and tenascin C reaction can be found in the perineuronal net (PN) around perikaryon, while the fibronectin reaction was found in the cytoplasm of neurons. The cause of the similarities between the distribution of HA and tenascin C can be that HA is connected to tenascin C in the PN. We showed the differences of the HA and tenascin C reaction in the termination areas of the optic nerve by measuring their optical density.

In the second part of our study we examined the changes of the HA and tenascin C distribution after transecting the optic nerve. From the fifth survival day the intensity of reaction decreased in nucleus of Bellonci (nB) and lateral geniculate body (LGB) in both sides. Till the third postoperative week less decreasing can be found in the intact optic nerve fibers receiving side in both nuclei. The intensity of the reaction in nB decreased in a less degree than in LGB in all investigated stages and this difference could be observed in both sides. With both of the reactions we found disintegration of the PN in the LGB on the regenerating optic nerve fibers receiving side between the second-fourth weeks. This finding indicates to that HA and tenascin C are important for the initiation of regeneration. Increasing of the reaction intensity in later reintegration stages shows that reexpression of HA and tenascin C can contribute to the stabilization of new synaptic connections in the reintegrating PN. The degree of changes was less in the layers of the optic tectum than in the diencephalic centers. According to our results it can be established that the optic nerve regeneration is accompanied by qualitative and quantitative changes of HA and tenascin C in the optic centre of frog.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

Köszönettel tartozom tudományos témavezetőimnek Dr. Módis László egyetemi tanárnak és Dr. Matesz Klára egyetemi tanárnak, hogy tanácsaikkal munkámat segítették.

Köszönettel tartozom Székely György akadémikusnak, aki sok hasznos észrevétellel segítette munkámat.

Köszönöm az Anatómiai Intézet jelenlegi igazgatójának, Dr. Antal Miklós egyetemi tanárnak, hogy munkámat lehetővé tette az intézetben.

Köszönöm mindazok munkáját, akik a kísérletek technikai kivitelezésében voltak segítségemre, elsősorban Szanitter Bélánénak és Bárány Sándornénak.

Köszönöm szüleimnek, hogy támogatták tanulmányaimat és bíztak bennem. Külön köszönöm a férjem türelmét.

10. IRODALOMJEGYZÉK

- Ajemian A, Ness R, David S. 1994. Tenascin in the injured rat optic nerve and in non-neuronal cells in vitro: potential role in neural repair. *J Comp Neurol* 340:233-242.
- Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. 1990. CD44 is a principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61:1303-1313.
- Asher R, Bignami A. 1991. Localization of hyaluronate in primary glial cell cultures derived from newborn rat brain. *Exp Cell Res* 195:401-411.
- Bartsch U, Bartsh S, Dörries U, Schachner M. 1992a. Immunohistological localization of tenascin in the developing and lesioned adult mouse optic nerve. *Eur J Neurosci* 4:338-352.
- Bartsch S, Bartsch U, Dörries U, Faissner A, Weller A, Ekblom P, Schachner M. 1992b. Expression of tenascin in the developing and adult cerebellar cortex. *J Neurosci* 12:736-749.
- Bastmeyer M, Schlosshauer B, Stürmer CAO. 1990. The spatiotemporal distribution of N-CAM in the retinotectal pathway of adult goldfish detected by monoclonal antibody D3. *Development* 108:299-311.
- Battisti WP, Shinar Y, Schwartz M, Levitt P, Murray M. 1992. Temporal and spatial patterns of expression of laminin, chondroitin sulphate proteoglikán and HNK-1 immunoreactivity during regeneration in the goldfish optic nerve. *J Neurocytol* 21:557-573.
- Beazley LD. 1984. Formation of specific synaptic connections in the visual system of lower vertebrates. In: Jones DG (ed) *Current topics in research on synapses*. Liss, New York, pp 53-118.
- Becker T, Becker CG, Niemann U, Naujoks-Manteuffel C, Bartsch U, Schachner M, Roth G. 1995. Immunohistological localization of tenascin-C in the developing and regenerating retinotectal system of two Amphibian species. *J Comp Neurol* 360:643-657.
- Becker CG, Becker T, Meyer RL, Schachner M. 1999. Tenascin-R inhibits the growth of the optic fibers in vitro but is rapidly eliminated during optic nerve regeneration in the salamander *Pleurodeles waltl*. *J Neurosci* 19:813-827.
- Becker T, Anliker B, Becker CG, Taylor J, Schachner M, Meyer RL, Bartsch U. 2000. Tenascin-R inhibits regrowth of optic fibers in vitro and persists in the optic nerve of mice after injury. *Glia* 29:330-346.
- Beggah AT, Dours-Zimmermann MT, Barras FM, Brosius A, Zimmermann DR, Zurn AD. 2005. Lesion-induced differential expression and cell association of neurocan, brevican, versican V1 and V2 in the mouse dorsal root entry zone. *Neurosci* 133:749-762.
- Bellonci J. 1888. Über die centrale Eidigung des Nervus opticus bei den Vertebraten. *Zwiss Zool* 47:1-46.

- Bennett JL, Zeiler SR, Jones KR. 1999. Patterned expression of BDNF and NT-3 in the retina and anterior segment of the developing mammalian eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:2996-3005.
- Bignami A, Asher R. 1992. Some observations on the localization of hyaluronic acid in adult, newborn and embryonal rat brain. *Int J Dev Neurosci* 10:45-48.
- Bignami A, Asher R, Perides G. 1992. Co-localization of hyaluronic acid and chondroitin sulfate proteoglycan in rat cerebral cortex. *Brain Res* 579:173-177.
- Blanco RE, Marrero H, Orkland PM, Orkland RK. 1993. Changes in ultrastructure and voltage-dependent currents at the glia limitans of the frog optic nerve following retinal ablation. *Glia* 8:97-105.
- Blanco RE, Orkland PM. 1996. Astrocytes and regenerating axons at the proximal stump of the severed frog optic nerve. *Cell Tissue Res* 286:337-345.
- Blaugrund E, Lavie V, Cohen I, Solomon A, Schreyer DJ, Schwartz M. 1993. Axonal regeneration is associated with glial migration: comparison between the injured optic nerves of fish and rats. *J Comp Neurol* 330:105-112.
- Bohn RC, Stelzner. 1981a. The aberrant retino-retinal projection during optic nerve regeneration in the frog. I. Time course of formation and cells of origin. *J Comp Neurol* 196:605-620.
- Bohn RC, Stelzner. 1981b. The aberrant retino-retinal projection during optic nerve regeneration in the frog. II. Anterograde labelling with horseradish peroxidase *J Comp Neurol* 196:621-632.
- Bohn RC, Stelzner. 1981c. The aberrant retino-retinal projection during optic nerve regeneration in the frog. III. Effects of crushing both nerves. *J Comp Neurol* 196:633-643.
- Brodal A, Pompeiano M, Walberg F. 1962. *The Vestibular Nuclei and Their Connections, Anatomy and Functional Correlations*. Boyd O (ed) Edinburgh, London.
- Bronner-Fraser M. 1988. Distribution and function of tenascin during cranial neural crest development in the chick. *J Neurosci Res* 21:135-147.
- Brückner G, Hansen D, Härtig W, Drlicek M, Arendt T, Brauer K. 1999. Cortical areas abundant in extracellular matrix chondroitin sulphate proteoglycans are less affected by cytoskeletal changes in Alzheimer's disease. *Neurosci* 92:791-805.
- Caminos E, Becker E, Martin-Zanca D, Vecino E. 1999. Neurotrophins and their receptors in the tench retina during optic nerve regeneration. *J Comp Neurol* 404:321-331.
- Celio MR, Blumcke I. 1994. Perineuronal nets-a specialized form of extracellular matrix in the adult nervous system. *Brain Res Rev* 19:128-145.
- Celio MR, Spreafico R, De Biassi S, Vitellaro-Zuccarello L. 1998. Perineuronal net: past and present. *Trends Neurosci* 21:510-515.

- Challacombe JF, Elam JS. 1997. Chondroitin 4-sulfate stimulates regeneration of goldfish retinal axons. *Exp Neurol* 143:10-17.
- Cheung WF, Cruz TF, Turley EA. 1999. Receptor for hyaluronan mediated motility (RHAMM), a hyaladherin that regulates cell responses to growth factors. *Biochem Soc Trans* 27:135-142.
- Chun JJM, Shatz CJ. 1988. A fibronectin-like molecule is present in the developing cat cerebral cortex and is correlated with subplate neurons. *J Cell Biol* 106:857-872.
- Chung C-Y, Murphy-Ullrich JE, Erickson HP. 1996. Mitogenesis, cell migration, and loss of focal adhesions induced by tenascin-C interacting with its cell surface receptor, annexin-II. *Mol Biol Cell* 7:883-892.
- Crossin KL, Hoffman S, Grumet M, Thiéry JP, Edelman GM. 1986. Site-restricted expression of cytotactin during development of the chicken embryo. *J Cell Biol* 102:1917-1930.
- Crossin KL, Hoffman S, Tan S-S, Edelman GM. 1989. Cytotactin and its proteoglikán ligand mark structural and functional boundaries in somatosensory cortex of the early postnatal mouse. *Dev Biol* 136:381-392.
- Currie JR. 1974. Some observations on the development of the visual system in the frog, *Rana pipiens*. Doctoral dissertation. Washington Univ St Louis, Mo.
- Currie JR, Cowan WM. 1974. Evidence for the late development of the uncrossed retinothalamic projections in the frog, *Rana pipiens*. *Brain Res* 71:133-139.
- Delpech B, Delpech A, Brückner G, Girard N, Maingonnat C. 1989. Hyaluronan and hyaluronectin in the nervous system. In: Whelan ED, editor: *Biology of Hyaluronan*. John Wiley and Sons, Chichester, pp 208-232.
- Dityatev A, Schachner M. 2003. Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nature* 4:456-468.
- Dörries U, Taylor J, Xia Z, Lochter A, Montag D, Schachner M. 1996. Distinct effects of recombinant tenascin domains on neuronal cell adhesion, growth cone guidance, and neuronal polarity. *J Neurosci Res* 43:420-438.
- Downie SA, Newman SA. 1995. Different roles of fibronectin in the generation of fore and hind limb precartilaginous condensations. *Develop Biol* 172:512-530.
- Dunlop SA, Beazley LD. 1984. A morphometric study of the retinal ganglion cell layer and optic nerve from metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Vision Res* 24:417-427.
- Dunlop SA, Tran N, Papadimitriou JM, Stirling RV, Beazley LD. 1997. Optic nerve regeneration in lizards. *Proc Aust Neurosci Soc* 8:74.
- Dunlop SA, Ngan Tran, Tee LBG, Papadimitriou J, Beazley LD. 2000. Retinal projections throughout optic nerve regeneration in the ornate dragon lizard, *Ctenophorus ornatus*. *J Comp Neurol* 416:188-200.

- Duprey-Diaz MV, Soto I, Blagburn JM, Blanco RE. 2002. Changes in brain-derived neurotrophic factor and TRKB receptor in adult *Rana pipiens* retina and optic tectum after optic nerve injury. *J Comp Neurol* 454:456-469.
- Duprey-Diaz MV, Blagburn JM, Blanco RE. 2003. Neurotrophin-3 and TRKC in the frog visual system: changes after axotomy. *Brain Res* 982:54-63.
- Edelman GM. 1985. Cell adhesion molecule expression and the regulation of morphogenesis. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 50:877-879.
- Eggl PS, Lucoqo J, Ott P, Graber W, van der Zypen E. 1992. Ultrastructural localization of hyaluronan in the myelin sheaths of the rat central and rat and human peripheral nervous systems using hyaluronan-binding protein-gold and link protein-gold. *Neuroscience* 48:737-744.
- Entwistle J, Hall CL, Turley EA. 1996. HA receptors: regulators of signalling to the cytoskeleton. *J Cell Biochem* 61:569-577.
- Epperlein HH, Halfter W, Tucker RP. 1988. The distribution of fibronectin and tenascin along migratory pathways of the neuronal crest in the trunk of amphibian embryos. *Development* 103:743-756.
- Evanko MC, Wight TN. 1999. Intracellular localization of hyaluronan in proliferating cells, *J Histochem Cytochem* 47:1331-1342.
- Faissner A, Schachner M. 1995. Tenascin and janusin: glial recognition molecules involved in neural development and regeneration. In: Kettenmann H, Ransom BR (eds) *Neuroglia*. Oxford University Press, Oxford, pp 411-427.
- Faissner A, Steindler D. 1995. Boundaries and inhibitory molecules in developing neural tissues. *Glia* 13:233-254.
- Faissner A. 1997. The tenascin gene family in axon growth and guidance. *Cell Tissue Res* 290:331-341.
- Feldheim DA, Kim YI, Bergemann AD, Frisen J, Barbacid M, Flanagan JG. 2000. Genetic analysis of ephrin-A2 and ephrin-A5 shows their requirement in multiple aspects of retinocollicular mapping. *Neuron* 25:563-574.
- Feng AS, Lin W. 1991. Differential innervation patterns of the three divisions of frog auditory midbrain (torus semicircularis). *J Comp Neurol* 306:613-630.
- Fitzgerald KA, Bowie AG, Skeffington BS, O'Neil LA. 2000. Ras, protein kinase C zeta, and I kappa B kinases 1 and 2 are downstream effectors of CD 44 during the activation of NF-kappa B by hyaluronic acid fragments in T-24 carcinoma cells. *J Immunol* 164:2053-2063.
- Fox K, Caterson B. 2002. Neuroscience. Freeing the brain from the perineuronal net. *Science* 298:1187-1189.
- Frahner JP. 1999. The transitional zone and CNS regeneration. *J Anat* 194:161-182.

Frisén J, Yates PA, McLaughlin T, Friedman GC, O'Leary DDM, Barbacid M. 1998. Ephrin-A5 (AL-1/RAGS) is essential for proper retinal axon guidance and topographic mapping in mammalian visual system. *Neuron* 20:235-243.

Frontera JG. 1952. A study of the anuran diencephalon. *J Comp Neurol* 96:1-69.

Fryer HJL, Kelly GM, Molinaro L, Hockfield S. 1992. The high molecular weight Cat-301 chondroitin sulfate proteoglikán from brain is related to the large aggregating proteoglikán from cartilage, aggrecan. *J Biol Chem* 267:9874-9883.

Gaupp E. 1899. Anatomie des Frosches. In: Ecker and Wiederschein editors. Braunschweig: Weiweg.

Gaze RM. 1970. Formation of nerve connections. Academic Press, New York.

Golgi C. 1893. Intorno all'origine del quarto nervo cerebrale e una questione isto-fisiologica che a questo argomento si collega, Rendiconti della Reale Accademia dei Lincei (21 maggio) 2:443-450.

Gong H, Underhill CB, Fredde TF. 1994. Hyaluronan in the bovine ocular anterior segment, with emphasis on the outflow pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:4328-4332.

González ML, Silver J. 1994. Axon-glia interactions regulate ECM patterning in the postnatal rat olfactory bulb. *J Neurosci* 14:6121-6131.

Gorlick DL, Constantine-Paton M, Kelley DB. 1984. A ¹⁴C-2-deoxyglucose autoradiographic investigation of sensory inputs to the optic tectum of *Rana pipiens*. *J Comp Physiol A* 154:617-624.

Gotz B, Scholze A, Clement A, Joester A, Schutte K, Wigger F, Frank R, Spiess E, Ekblom P, Faissner A. 1996. Tenascin-C contains distinct adhesive, anti-adhesive, and neurite outgrowth promoting sites for neurons. *Mol Cell Neurosci* 10:100-116.

Grobstein P, Comer C. 1983. The nucleus isthmoi as an intertectal relay for the ipsilateral oculotectal projection in the frog, *Rana pipiens*. *J Comp Neurol* 217:54-74.

Grumet M, Hoffmann S, Crossin KL, Edelman GM, 1985. Cytotactin, an extracellular matrix of neural and non-neural tissues that mediates glia-neuron interaction. *Proc Natn Acad Sci USA* 82:8075-8079.

Grumet M, Milev P, Sakurai T, Karthikeyan L, Bourdon M, Margolis RK, Margolis RU. 1994. Interactions with tenascin and differential effects on cell adhesion of neurocan and phosphacan two major chondroitin sulfate proteoglikáns of nervous tissue. *J Biol Chem* 269:12142-12146.

Hall JC, Feng W. 1987. Evidence for parallel processing in the frog's auditory thalamus. *J Comp Neurol* 258:407-419.

Hartmann U, Maurer P. 2001. Proteoglikáns in the nervous system-the quest for the functional roles in vivo. *Matrix Biol* 20:23-35.

- Herrick CJ. 1925. The amphibian forebrain. III. The optic tracts and centers of *Amblystoma* and the frog. *J Comp Neurol* 39:433-489.
- Hockfield S, McKay RD. 1983. A surface antigen expressed by a subset of neurons in the vertebrate central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:5758-5761.
- Holder N, Klein R. 1999. Eph receptors and ephrins. Effectors of morphogenesis. *Development* 126:2033-2044.
- Holley RW. 1975. Control of growth of mammalian cells in cell culture. *Nature* 258: 487-490.
- Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lenas P, Yamada Y, Imagawa M, Shinomura T, Hamaguchi M, Yoshida Y, Ohnuki Y, Miyauchi S, Spicer AP, McDonald JA, Kimata K. 1999. The three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem* 274:25085-25092.
- Jacobson M. 1991. Developmental neurobiology. Plenum Press, New York.
- Joester A, Faissner A. 2001. The structure and function of tenascins in the nervous system. *Matrix Biol* 20:13-22.
- Kaaijk P, Pals ST, Morsink F, Bosch DA, Troost D. 1997. Differential expression of CD44 splice variants in the normal human central nervous system. *J Neuroimmunol* 73:70-76.
- Knapp H, Scalia F, Riss W. 1965. The optic tracts of *Rana pipiens*. *Acta Neurol Scand* 41:325-355.
- Knudson CB, Knudson W. 1993. Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease. *FASEB J* 7:1233-1241.
- Lammi PE, Lammi MJ, Tammi RH, Helminen HJ, Espanha MM. 2001. Strong hyaluronan expression in the full-thickness rat articular cartilage repair tissue. *Histochem Cell Biol* 115:301-308.
- Lander AD. 1987. Molecules that make axons grow. *Mol Neurobiol* 1:213-245.
- Lander C, Kind P, Maleski M, Hockfield S. 1997. A family of activity-dependent neuronal cell-surface chondroitin sulfate proteoglycans in cat visual cortex. *J Neurosci* 17:1928-1939.
- Laurent TC, Fraser JR, Pertoft H, Smedsord B. 1986. Binding of hyaluronate and chondroitin sulphate to liver endothelial cells. *Biochem J* 234:653-658.
- Laurent TC, Fraser JRE. 1992. Hyaluronan. *FASEB J* 6:2397-2402.
- Laurent TC. 1998. The Chemistry, Biology and Medical application of Hyaluronan and its Derivatives. Portland Press Ltd, London.
- Laywell ED, Dörries U, Bartsch U, Faissner A, Schachner M, Steindler DA. 1992. Enhanced expression of the developmentally regulated extracellular matrix molecule tenascin following adult brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:2634-2638.

- Lázár G, Székely G. 1967. Golgi studies on the optic center of the frog. *J Hirnforsch* 9:329-344.
- Lázár G, Székely G. 1969. Distribution of optic terminals in the different optic centres of the frog. *Brain Res* 16:1-14.
- Lázár G. 1971. The projection of the retinal quadrants on the optic centres in the frog. A terminal degeneration study. *Acta Morphol Acad Sci Hung* 19:325-34.
- Lázár G. 1978. Application of cobalt-filling technique to show retinal projections in the frog. *Neuroscience* 3:725-736.
- Lesley J, Hyman R, Kincade PW. 1993. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol* 54:271-335.
- Lesley J, Hascall VC, Tammi M, Hyman R. 2000. Hyaluronan binding by cell surface CD44. *J Biol Chem* 275:26967-26975.
- Liuzzi FJ, Lasek RJ. 1983. Regenerating of sensory and motor axons into the spinal cord of the adult frog. A study using dorsal to dorsal and ventral to dorsal root anastomoses. *Neurosci Abst* 9:695.
- Liuzzi FJ, Lasek RJ. 1985. Regeneration of lumbar dorsal root axons into the spinal cord of adult frogs (*Rana pipiens*), an HRP study. *J Comp Neurol* 232:456-465.
- Lynn BD, Li X, Cattini PA, Turley EA, Nagy JI. 2001. Identification of sequence, protein isoforms, and distribution of the hyaluronan-binding protein RHAMM in adult and developing rat brain. *J Comp Neurol* 439:315-330.
- Mackie EJ, Tucker RP, Halfter W, Chiquet-Ehrismann R, Epperlein HH. 1988. The distribution of tenascin coincides with pathways of neuronal crest cell migration. *Development* 102:237-250.
- Margolis RU, Margolis RK, Chang LB, Preti C. 1975. Glükózaminoglikáns of brain during development. *Biochemistry* 14:85-88.
- Margolis RU, Margolis RK. 1997. Chondroitin sulfate proteoglikáns as mediators of axon growth and pathfinding. *Cell Tissue Res* 290:343-348.
- Martini R, Schachner M, Faussner A. 1990. Enhanced expression of the extracellular matrix molecule J1/tenascin in the regenerating adult mouse sciatic nerve. *J Neurocytol* 19:601-616.
- McAdams BD, McLoon SC. 1995. Expression of chondroitin sulfate and keratan sulfate proteoglikáns in the path of growing retinal axons in the developing chick. *J Comp Neurol* 352:594-606.
- McFarlane S, McNeill L, Holt CE. 1995. FGF signaling and target recognition in the developing *Xenopus* visual system. *Neuron* 15:1017-1028.
- McFarlane S, Cornel E, Amaye E, Holt CE. 1996. Inhibition of FGF receptor activity in retinal ganglion cell axons causes errors in target selection. *Neuron* 17:245-254.

- McGachren SS, Lightner V. 1992. Expression of human tenascin in synovitis and its regulation by interleukin-1. *Arthritis Rheum* 35:1185-1196.
- McKeon RJ, Schreiber RC, Rudge JS, Silver J. 1991. Reduction of neurite growth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J Neurosci* 11:3398-3411.
- Meiners S, Geller HM. 1997. Long and short splice variants of human tenascin differentially regulate neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci* 10:100-116.
- Meiners S, Nur-e Kamal MS, Geller HM. 2001. Identification of neurite outgrowth promoting motif within the alternatively spliced region of tenascin-C. *J Neurosci* 21:7125-7225.
- Mészár Z, Matesz C, Szigeti ZM, Veress G, Székely G, Felszeghy S, Modis L. 2005. Distribution of hyaluronan and associated proteins in the spinal cord of chicken embryos. *FEBS J* 272-273.
- Módis L. 1991. Organization of the Extracellular Matrix: A Polarization Microscopic Approach. CRC Press, Boca Raton, p 46.
- Montgomery N, Fite KV. 1989. Retinotopic organization of central optic projections in *Rana pipiens*. *J Comp Neurol* 283:526-540.
- Morrison H, Sherman LS, Legg J, Banine F, Isacke C, Haipiek CA, Gutmann DH, Ponta H, Herrlich P. 2001. The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44. *Genes Dev* 15:968-980.
- Muñoz M, González A, Muñoz A, Navarro B, Terres A. 1992. Efferent connections of the trigeminal sensory nuclear complex in the frog *Rana ridibunda*. *Eur J Neurosci (Suppl 5)*:272
- Muñoz A, Muñoz M, González A, ten Donkelaar HJ. 1994. Spinothalamic projections in amphibians as revealed with anterograde tracing techniques. *Neurosci Lett* 171:81-84.
- Muñoz A, Muñoz M, González A, ten Donkelaar HJ. 1997. Spinal ascending pathways in amphibians: cells of origin and main targets. *J Comp Neurol* 378:205-228.
- Murray M, Edwards MA. 1982. A quantitative study of the optic reinnervation of the goldfish optic tectum following optic nerve crush. *J Comp Neurol* 209:363-373.
- Nakamoto M, Cheng HJ, Friedman GC, McLaughlin T, Hansen MJ, Yoon CH, O'Leary DDM, Flanagan JG. 1996. Topographically specific effects of ELF-1 on retinal axon guidance in vitro and retinal axon mapping in vivo. *Cell* 86:755-766.
- Neary TJ. 1988. Forebrain auditory pathways in ranid frogs. In: Fritsch B, Ryan MJ, Wilczynsky W, Hetherington TE, Walkowiak W (eds). The evolution of the amphibian auditory system. Wiley, New York, pp 233-252.
- Newman A, Kuruvilla A, Pereda A, Honrubia V. 1986. Regeneration of the eight cranial nerve. I. Anatomic verification in the bullfrog. *Laryngoscope* 96:484-493.

- Noble PW. 2002. Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biol* 21:25-29.
- Owens MR, Climino CD. 1982. Synthesis of fibronectin by the isolated perfused rat liver. *Blood* 59:1305-1309.
- Ozgenel GY. 2003. Effects of hyaluronic acid on peripheral nerve scarring and regeneration in rats. *Microsurgery* 23:575-581.
- Pearlman AL, Sheppard AM. 1996. Extracellular matrix in early cortical development. *Prog Brain Res* 108:117-134.
- Pearson CA, Pearson D, Shibahara S, Hofsteenge J, Chiquet-Ehrismann R. 1988. Tenascin: cDNA cloning and induction by TGF- β . *EMBO J* 7:2677-2681.
- Perez MT, Caminos E. 1995. Expression of brain-derived neurotrophic factor and of its functional receptor in neonatal and adult rat retina. *Neurosci Lett* 183:96-99.
- Philips GR, Edelman GM, Crossin KL. 1995. Separate cell binding sites within cytactin/tenascin differentially promote neurite outgrowth. *Cell Adh Commun* 3:257-271.
- Pizzi MA, Elam JS. 2004. Characterization of a chondroitin sulfate proteoglycan associated with regeneration in goldfish optic tract. *Neurochem Res* 29:719-728.
- Potter HD. 1969. Structural characteristics of cell and fiber populations in the optic tectum of the frog (*Rana catesbeiana*). *J Comp Neurol* 136:203-232.
- Potter HD. 1972. Terminal arborizations of retinotectal axons in the bullfrog. *J Comp Neurol* 144:269-283.
- Przedborski S, Mitumoto H, Rowland LP. 2003. Recent advances in amyotrophic lateral sclerosis research. *Curr Neurol Neurosci rep* 3:70-77.
- Ramer MS, McMahon SB, Priestley JV. 2001. Axon regeneration across dorsal root entry zone. *Progress in Brain Res* 132:621-639.
- Reichardt LF, Tomaselli TJ. 1991. Extracellular matrix molecules and their receptors. *Annu Rev Neurosci* 14:531-570.
- Rhodes KE, Fawcett JW. 2004. Chondroitin sulfate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS? *J Anat* 204:33-48.
- Riou JF, Shi DL, Chiquet M, Boucaut JC. 1988. Expression of tenascin in response to neural induction in amphibian embryos. *Development* 104:511-524.
- Ripellino JA, Bailo M, Margolis RU, Margolis RK. 1988. Light and electron microscopic studies on the location of hyaluronic acid in developing rat brain. *J Cell Biol* 106:845-855.
- Roden L, CamFPell P, Fraser JR, Laurent TC, Pertoft H, Thomson JN. 1989. Enzymic pathways of hyaluronan catabolism. *Ciba Found Symp* 143:60-76.

- Roth G, Nishikawa KC, Naujoks-Manteuffel C, Schmidt A, Wake DB. 1993. Paedomorphosis and simplification in the nervous system of salamanders. *Brain Behav Evol* 42:137-170.
- Rothig P. 1923. Beiträge zum Studium des Centralnervensystems der Wirbeltiere. 8. Über des Zwischenhirn der Amphibien. *Arch Mikr Anat* 98:616-645.
- Rungger-Brändle, Achstätter T, Franke WW. 1989. An epithelium-type citoskeleton in a glial cell: astrocytes of amphibian optic nerves contain cytokeratin filaments and are connected by desmosomes. *J Cell Biol* 109:705-716.
- Sainte-Marie G. 1962. A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. *J Histochem Cytochem* 10:250-256.
- Scalia F. 1973. Autoradiographic demonstration of optic fibers in the stratum zonale of the frog's tectum. *Brain Res* 58:484-488.
- Scalia F, Colman DR. 1974. Identification of telencephalic-afferent thalamic nuclei associated with the visual system of the frog. *Neurosci Abst* 1:46.
- Scalia F, Fite K. 1974. A retinotopic analysis of the central connections of the optic nerve in the frog. *J Comp Neurol* 158:455-478.
- Schultze M. 1867. Über Stäbchen und Zapfen der Retina. *Arch mikr Anat* 3:215-247.
- Schwartzbauer JE. 1991. Fibronectin: from gene to protein. *Curr Opin Cell Biol* 3:786-791.
- Scott JE. 1998. Chemical morphology of hyaluronan. In: Laurent TC (ed) *The Chemistry, Biology and Medical application of Hyaluronan and its Derivatives*. Portland Press Ltd, London, pp 7-15.
- Seckel BR., Jones D, Hekimian KJ, Wang KK, Chakalis DP, Costas PD. 1995. Hyaluronic acid through a new injectable nerve guide delivery system enhances peripheral nerve regeneration in rat. *J Neurosci Res* 40:318-324.
- Sheppard AM, Brunstorm JE, Thornton TN, Gerfen RW, Broekelmann TJ McDonald JA, Pearlman AL. 1995. Neuronal production of fibronectin in the cerebral cortex during migration and layer formation is unique to specific cortical domains. *Dev Biol* 172:504-518.
- Sherman L, Sleeman J, Herrlich P, Ponta H. 1994. Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 6:726-733.
- Sperry RW. 1951. Mechanisms of neural maturation. In: Stevens SS (ed) *Handbook of psychology*. Wiley, New York, pp 236-280.
- Sperry RW. 1963. Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. *Proc Natl Acad Sci USA* 50:703-710.
- Spicer AP, Seldin MF, Olsen AS, Brown N, Wells SE, Doggett NA, Itano N, Kimata K, Inazawa J, McDonald JA. 1997. Chromosomal localization of the human and mouse hyaluronan synthase genes. *Genomics* 41:493-497.

- Stelzner DJ, Bohn RC, Strauss JA. 1981. Expansion of the ipsilateral retinal projection in the frog brain during optic nerve regeneration: sequence of reinnervation and retinotopic organization. *J Comp Neurol* 201:299-317.
- Steindler DA, Cooper NGF, Faissner A, Schachner M. 1989. Boundaries defined by adhesion molecules during development of the cerebellar cortex: the J1/tenascin glycoprotein in the mouse somatosensory cortical barrel field. *Dev Biol* 131:243-260.
- Steinmetz MP, Horn KP, Tom VJ, Miller JH, Busch SA, Nair D, Silver DJ, Silver J. 2005. Chronic enhancement of the intrinsic growth capacity of sensory neurons combined with the degradation of inhibitory proteoglycans allows functional regeneration of sensory axons through the dorsal root entry zone in the mammalian spinal cord. *J Neurosci* 25:8066-8076.
- Stettler EM, Galileo DS. 2004. Radial glia produce and align the ligand fibronectin during neuronal migration in the developing chick brain. *J Comp Neurol* 468:441-451.
- Strobel G, Stuermer CA. 1994. Growth cones of regenerating retinal axons contact a variety of cellular profiles in the transected goldfish optic nerve. *J Comp Neurol* 21:23-43.
- Székel G. 1976. The morphology of motoneurons and dorsal root fibers in the frog's spinal cord. *Brain Res* 103:275-90.
- Tammi R, Ripellino JA, Margolis RU, Maibach HI, Tammi M. 1989. Hyaluronate accumulation in human epidermis treated with retinoic acid in skin organ culture. *J Invest Dermatol* 92:326-332.
- ten Donkelaar HJ. 1998. Anurans. In: Nieuwenhuys R, ten Donkelaar HJ, Nicholson C (eds) *The Central System of Vertebrates Vol. 2*. Springer, Berlin Heidelberg, pp 1154-1314.
- Theiss C, Güntürkün O. 2001. Distribution of BDNF, NT-3, TRKB and TRKC in the developing retino-tectal system of the pigeon *Columba livia*. *Anat Embryol* 204:27-37.
- Theodosis DT, Pierre K, Cadoret MA, Allard M, Faissner A, Poulain DA. 1997. Expression of high levels of the extracellular matrix glycoprotein, tenascin-C, in the normal adult hypothalamoneurohypophyseal system. *J Comp Neurol* 379:386-398.
- Tom VJ, Doller CM, Malouf AT, Silver J. 2004. Astrocyte-associated fibronectin is critical for axonal regeneration in adult white matter. *J Neurosci* 24:9282-9290.
- Toole BP. 1982. Developmental role of hyaluronate. *Con Tiss Res* 10:93-100.
- Tóth P, Czank G, Lázár G. 1985. Morphology of the cells of origin of descending pathways to the spinal cord in *Rana esculenta*. A tracing study using cobaltic-lysine complex. *J Hirnforsch* 26:365-383.
- Tóth P, Lázár G, Wang S-R, Li T-B, Xu J, Pal E, Strazinck C. 1994. The contralaterally projecting neurons of the isthmus nucleus in five anuran species: a retrograde tracing study with HRP and cobalt. *J Comp Neurol* 346:306-320.

- Tuckett F, Morris-Kay G. 1988. Alcian blue staining of glükózaminoglikáns in embryonic material: effect of different fixatives. *Histochem J* 20:174-182.
- von Bartheld CS. 1998. Neurotrophins in developing and regenerating visual system. *Histol Histopathol* 13:437-459.
- Walz A, McFarlane S, Brickman YG, Nurcombe V, Bartlett PF, Holt CE. 1997. Essential role of heparan sulfates in axon navigation and targeting in the developing visual system. *Development* 124:2421-2430.
- Wang KK, Nemeth IR, Seckel BR, Chakalis-Haley DP, Swann DA, Kuo JW, Bryan DJ, Cetrulo CL. Jr. 1998. Hyaluronic acid enhances peripheral nerve regeneration in vivo. *Microsurgery* 18:270-275.
- Weigel PH, Hascall VC, Tammi M. 1997. Hyaluronan synthases. *J Biol Chem* 272:13997-14000.
- West DC, Kumar S. 1989. The effect of hyaluronate and its oligosaccharides on endothelial cell proliferation and monolayer integrity. *Exp Cell Res* 183:179-196.
- Whitworth IH, Brown RA, Dore C, Green CJ, Terenghi G. 1995. Oriented mats of fibronectin as a conduit material for use in peripheral nerve repair. *J Hand Surg* 20:429-436.
- Yamagata M, Yamada KM, Yoneda M, Suzuki S, Kimata K. 1986. Chondroitin sulfate proteoglikán (PG-M-like proteoglikán) is involved in the binding of hyaluronic acid to cellular fibronectin. *J Biol Chem* 261:13526-13535.
- Yasuhara O, Akiyama H, McGeer EG, McGeer PL. 1994. Immunohistochemical localization of hyaluronic acid in rat and human brain. *Brain Res* 635:269-282.

11. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

IN EXTENSO KÖZLEMÉNYEK:

1. **Szigeti ZM**, Matesz C, Székely G, Felszeghy S, Bacskai T, Halasi G, Mészár Z, Modis L: Distribution of hyaluronic acid in the central nervous system of the frog. J Comp Neurol. 496:819-831. 2006 **IF:3,400**
2. Matesz C, Módis L, Halasi G, **Szigeti ZM**, Felszeghy S, Bacskai T, Székely G: Extracellular matrix molecules and their possible roles in the regeneration of frog nervous system. Brain Res Bull. 66:526-31. 2005 **IF:2,283**

EGYÉB IN EXTENSO KÖZLEMÉNY:

1. Halasi G, Bácskai T, Wolf E, Módis L, Székely G, Mészár Z, **Szigeti ZM**, Matesz C: Vestibular lesion-induced changes in the expression of the hyaluronan in the frog, *Rana esculenta*. In preparation. Exp Brain Res.

KONGRESSZUSI ABSZTRAKTOK

1. Matesz C, Módis L, **Szigeti ZM**, Felszeghy S, Bácskai T, Halasi G, Székely G: Extracellular matrix molecules in the nervous system of the frog. Magyar Idegtudományi Társaság Kongresszusa, Balatonfüred, 2003. Clinical Neurosci. 56: 2. 57.
2. **Szigeti ZM**, Matesz C, Bácskai T, Halasi G, Matesz C: Hyaluronan distribution pattern in the nervous system of the frog. Magyar Idegtudományi Társaság Kongresszusa, Balatonfüred, 2003. Clinical Neurosci. 56: 2. 86-87.
3. **Szigeti ZM**, Matesz C, Bácskai T, Halasi G, Székely G, Módis L: Distribution of tenascin-C and fibronectin in the nervous system of the frog. IBRO International Workshop, Budapest, 2004. Clinical Neurosci. 57: 1. 65.
4. Matesz C, Módis L, Halasi G, **Szigeti ZM**, Felszeghy S, Bácskai T, Székely G: Extracellular matrix molecules and their possible role in the regeneration of the frog nervous system. Congress Book of 4th ECCN. Oxford. 2004.
5. **Szigeti ZM**, Mészár Z, Matesz C, Módis L, Székely G: Expression of extracellular matrix molecules during optic nerve regeneration in the frog. Magyar Idegtudományi Társaság Kongresszusa, Pécs, 2005. Clinical Neurosci. 58: 1. 62.
6. Mészár Z, Matesz C, **Szigeti ZM**, Székely G, Felszeghy Sz, Módis L: Expression of hyaluronan and hyaluronan binding proteins during spinal cord development of chicken

embryos. Magyar Idegtudományi Társaság Kongresszusa, Pécs, 2005. Clinical Neurosci. 58: 1. 66-67.

7. **Szigeti ZM**, Mészár Z, Matesz K, Bácskai T, Székely G, Módos L: Distribution of the extracellular matrix molecules in the visual system of the frog. IBRO International Workshop, Budapest, 2006. Clinical Neurosci.