

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Extracellularis mátrix molekulák eloszlása  
a nucleii precerebellares és a bulbus olfactorius területén**

**Hunyadi Andrea**

**Témavezető: Dr. Rácz Éva**



**DEBRECENI EGYETEM  
IDEGTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA  
DEBRECEN, 2020.**

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>AZ ÉRTEKEZÉSBEN ELŐFORDULÓ RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b>	4
<b>1. BEVEZETÉS</b>	5
<b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b>	7
2.1. Extracellularis mátrix	7
2.1.1. Az ECM molekuláris összetétele	7
2.1.1.1. Proteoglikánok	7
2.1.1.2. Hialuronsav	8
2.1.1.3. Kötőfehérjék	9
2.1.1.4. A tenaszcin család tagjai	9
2.1.2. Az ECM megjelenési formái és funkciója	11
2.1.3. Synapticus plaszticitás és az ECM	14
2.2. Nuclei precerebellares	16
2.2.1. Oliva inferior	17
2.2.2. Nucleus prepositus hypoglossi	20
2.3. Bulbus olfactorius	22
2.3.1. Glomerularis réteg	23
2.3.2. Külső plexiform réteg	25
2.3.3. Mitralis sejtek rétege	26
2.3.4. Belső plexiform réteg	27
2.3.5. Granularis sejtek rétege	27
2.3.6. A BO és a synapticus plaszticitás	28
2.4. Célkitűzés	30
<b>3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEK</b>	31
3.1. Mintaelőkészítés	31
3.2. Hisztokémiai reakciók	31
3.2.1. Oliva inferior, nucleus prepositus hypoglossi	31
3.2.2. Bulbus olfactorius	32
3.3. Immunhisztokémiai reakciók	32
3.3.1. Oliva inferior, nucleus prepositus hypoglossi	32
3.3.2. Bulbus olfactorius	33
3.3.2.1. Kettős fluoreszcens jelölés	34
3.4. Az eredmények feldolgozása	36
3.4.1. Oliva inferior, nucleus prepositus hypoglossi	36
3.4.2. Bulbus olfactorius	36

3.4.3. A hisztokémiai és immunhisztokémiai reakciók szemikvantitatív kiértékelése	36
<b>4. EREDMÉNYEK</b>	37
4.1. Oliva inferior	37
4.2. Nucleus prepositus hypoglossi	42
4.3. Bulbus olfactorius	45
4.3.1. Hialuronsav	45
4.3.2. Kondroitin szulfát proteoglikánok általános kimutatása – WFA	46
4.3.3. Aggrekán	49
4.3.4. Brevikán	51
4.3.5. Neurokán	53
4.3.6. Verzikán	54
4.3.7. Tenascin-R	55
4.3.8. HAPLN1	56
<b>5. MEGBESZÉLÉS</b>	60
5.1. Az extracellularis mátrix és a synapticus plaszticitás kapcsolata	60
5.2. Az ECM molekulák eloszlása az oliva inferior, a nucleus prepositus hypoglossi és a bulbus olfactorius területén	62
5.2.1. Oliva inferior	62
5.2.2. Nucleus prepositus hypoglossi	65
5.2.3. Bulbus olfactorius	66
5.2.3.1. Glomerularis réteg	66
5.2.3.2. Külső plexiform réteg	67
5.2.3.3. Belső plexiform réteg	68
5.2.3.4. Granularis sejtek rétege	69
<b>6. ÖSSZEFOGLALÁS</b>	70
<b>SUMMARY</b>	71
<b>7. IRODALOMJEGYZÉK</b>	72
<b>SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE</b>	81
<b>8. TÁRGYSZAVAK</b>	82
<b>9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b>	83
<b>10. FÜGGELÉK</b>	84

## **AZ ÉRTEKEZÉSBEN ELŐFORDULÓ RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE**

<b>AC</b>	az axon terminálist körülvevő ECM hüvely
<b>bHABP</b>	biotinilált hialuronsavkötő fehérje
<b>BO</b>	bulbus olfactorius
<b>BSA</b>	szarvasmarha szérum albumin
<b>bWFA</b>	biotinilált <i>Wisteria floribunda</i> agglutinin
<b>CAT-301</b>	anti-kondroitin szulfát proteoglikán CAT-301 klón
<b>CSPG</b>	kondroitin szulfát proteoglikán
<b>DAO</b>	dorsal accessory olive
<b>DC</b>	dorsal cap
<b>DMCC</b>	dorsomedial cell column
<b>dSA</b>	deep short axon sejtek
<b>ECM</b>	extracellularis mátrix
<b>EPL</b>	külső plexiform réteg
<b>GL</b>	glomerularis réteg
<b>GCL</b>	granularis sejtek rétege
<b>HA</b>	hialuronsav
<b>HAPLN1</b>	hialuronsavat és proteoglikánt kötő kapcsolófehérje 1
<b>IPL</b>	belső plexiform réteg
<b>MAO</b>	medial accessory olive
<b>MAP2</b>	mikrotubulus asszociált protein 2
<b>MCL</b>	mitralis sejtek rétege
<b>MVN</b>	nucleus vestibularis medialis
<b>NDS</b>	normál szamár szérum
<b>NGS</b>	normál kecske szérum
<b>NHS</b>	normál ló szérum
<b>NRS</b>	normál nyúl szérum
<b>OI</b>	oliva inferior
<b>PHN</b>	nucleus prepositus hypoglossi
<b>PNN</b>	perineuronális háló
<b>PO</b>	principal olive
<b>TN-R</b>	tenaszcin-R
<b>VLO</b>	ventrolateral outgrowth
<b>WFA</b>	<i>Wisteria floribunda</i> agglutinin

## 1. BEVEZETÉS

Az extracelluláris teret az extracelluláris mátrix (ECM) makromolekulái töltik ki a központi idegrendszerben, mikrokörnyezetet biztosítva ezáltal a neuronok és glia sejtek számára. Az ECM fő komponensei a hialuronsav, a kondroitin-szulfát proteoglikánok (aggrekán, brevikán, neurokán, verzikán) és a glikoproteinek, mint a tenascin-R és a kapcsoló fehérjék (pl.: HAPLN1). A kifejlett egyedek központi idegrendszerében az ECM makromolekulái képezhetnek kondenzált formákat (perineuronális net, nodális ECM, 'axonal coat') vagy mutathatnak diffúz elrendeződést a neuropilben. Saját és irodalmi adatok szerint az ECM molekuláris és struktúrális szerveződése a központi idegrendszer különböző területein párhuzamot mutat az ott található neuronok morfológiai, neurokémiai és funkcionális sajátásaival. Számos bizonyíték van arra vonatkozóan, hogy az ECM molekuláris összetétele és szerveződése jelentős mértékben függ a neuronok aktivitásától, valamint, hogy a pre- és postsynaptikus receptorok aktivitásának szabályozása által az ECM nagymértékben befolyásolja a neuronok működését, ezáltal a neuronális plaszticitást.

Előzetes vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a vestibularis léziót követően végbemenő kompenzációs folyamatok párhuzamot mutatnak az ECM expressziós mintázatának változásával a vestibularis magok területén, mely megfigyelés alapján feltételezhetjük az ECM lehetséges szerepét a vestibularis plaszticitásban. A vestibularis magok kiterjedt kapcsolatban állnak az agytörzsben található nucleii precerebellares területeivel (oliva inferior, nucleus prepositus hypoglossi), ami miatt elképzelhető, hogy az ECM expressziós mintázatának vestibularis léziót követő változásai kiterjednek ezen régiókra is. Annak érdekében, hogy a kompenzáció során végbemenő változások időbeliségét követni tudjunk, elengedhetetlen a nucleii precerebellares területén található ECM normál körülmények között történő feltérképezése. A vestibularis rendszer kapcsolatainak nagyfokú plaszticitását figyelembe véve, feltételezzük az ECM speciális, a konzervatívabb összeköttetésekkel rendelkező központi idegrendszeri területektől eltérő megjelenését a vestibularis magokkal kapcsolatban álló területeken.

Figyelmünk központjába került egy másik, igen magas fokú plaszticitással rendelkező neuronhálózat, a szaglórész. A bulbus olfactorius synapticus plaszticitás szempontjából az agy kitüntetett területét képviseli, hiszen neuronális hálózata folyamatosan átépülő rendszert képez. Az élethosszig tartó átszerveződés háttérében álló molekuláris mechanizmusok részleteikben nem ismertek, de ebben az esetben is feltételezhetjük az ECM

szerepét. E bonyolult átrendeződési folyamat megértéséhez szintén elkerülhetetlen az ECM felépítésének normál körülmények között történő leírása.

Az irodalmi adatok és korábbi vizsgálataink is azt sugallják, hogy az ECM molekulák jelenléte, illetve hiánya jelentős mértékben befolyásolja a központi idegrendszer synapticus plaszticitását és regenerációját. Jelen munkánk során célul tűztük ki ezen molekulahálózat összetételének pontos feltérképezését három olyan agyterületen (oliva inferior, nucleus prepositus hypoglossi, bulbus olfactorius), melyek fokozott synapticus plaszticitással rendelkeznek. Az általunk vizsgált területeken expresszált ECM molekulák kimutatása és ezen molekulák expressziós mintázatában megfigyelhető regionális különbségek feltárása, majd az eredmények összevetése a központi idegrendszer egyéb, kevésbé plasztikus területeinek vizsgálata során kapott eredményekkel, segítséget nyújthat az ECM synapticus plaszticitásban betöltött szerepének megismerésében.

## **2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS**

### **2.1. Extracellularis mátrix**

Az extracellularis tér a központi idegrendszer mintegy 20%-át képezi, amelyet az extracellularis mátrixot (ECM) felépítő molekulák hálózata, különböző ionok, citokinek, neurohormonok és növekedési faktorok töltenek ki. Az ECM fogalma a kötőszövetekhez kapcsolódóan már régóta ismert, azonban csak néhány évtizede írták le (Tani és Ametani, 1971), hogy az idegrendszer sejtjei által közrefogott térben szintén megtalálható. Az idegrendszer területén jelenlévő ECM szerkezete és molekuláris összetétele azonban különbözik a szervezet egyéb szöveteiben megtalálható sejt közötti állomány felépítésétől. Az 1970-es évek rendelkezésre álló módszereivel csak néhány makromolekula (hialuronsav (HA), a kondroitin-szulfát proteoglikánok (CSPG), fibronektin, kollagének) előfordulását sikerült igazolni (Margolis és mtsai., 1975), később a módszertani fejlődésnek köszönhetően, a már ismert makromolekuláris összetevők mellett különböző glikoproteinek, illetve kötőfehérjék jelenléte is bizonyíthatóvá vált (Carulli és mtsai., 2006; Dityatev és Schachner, 2003; Margolis és mtsai., 1975).

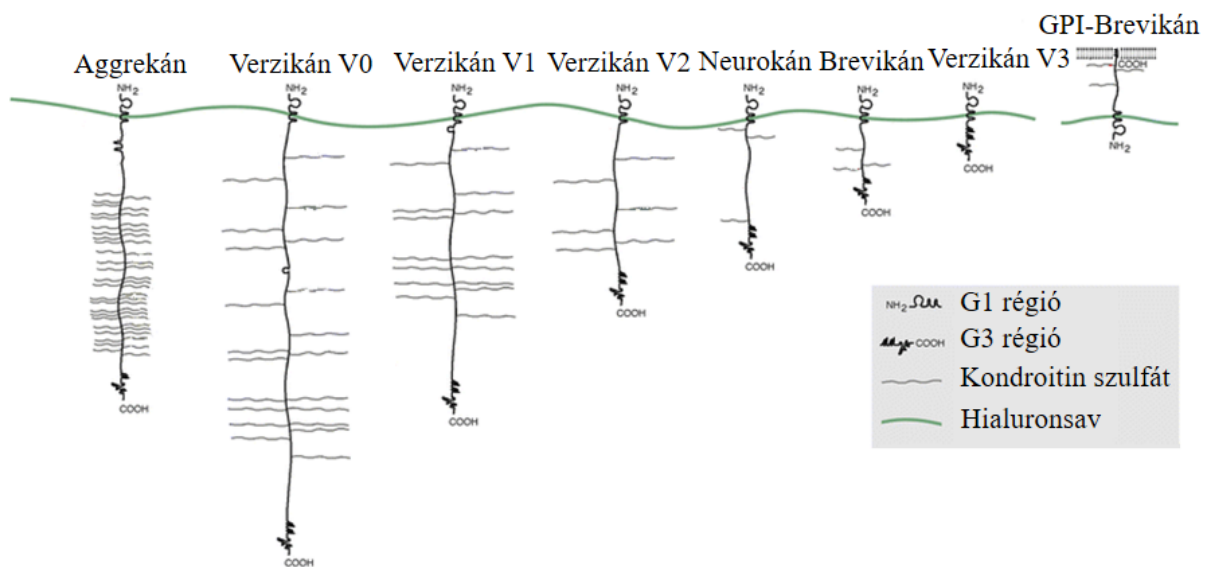
#### **2.1.1. Az ECM molekuláris összetétele**

##### **2.1.1.1. Proteoglikánok**

A proteoglikánok felépítésére jellemző, hogy a molekula központi részét egy tengelyfehérje (core protein) képezi, amelyhez glükózaminoglikán oldalláncok kapcsolódnak. A glükózaminoglikán oldalláncok ismétlődő diszacharid egységekből felépülő, hosszú, lineáris polimerek. A diszacharid egységeket felépítő monomerek egyike az uronsav, a másik komponens az N-acetil glükózamin vagy az N-acetil-galaktózamin. Polimerizációt követően az egyes cukor molekulák szulfatációs, illetve epimerizációs módosításai többféle glükózaminoglikán oldallánc kialakulását teszik lehetővé. A glükózaminoglikánok a diszacharid egységek felépítése alapján az alábbi négy csoportba sorolhatók: HA, heparán-szulfát/heparin, keratán-szulfát, kondroitin/dermatán-szulfát (Bandtlow és Zimmermann, 2000). A core proteinhez kapcsolódó glükózaminoglikán láncok száma, illetve hossza változó, amely több, eltérő funkcióval rendelkező proteoglikán kialakulását eredményezi (Rhodes és Fawcett, 2004).

A proteoglikánok egy csoportját a CSPG-ok alkotják, melyek szulfatált glükózaminoglikán oldallánccal rendelkeznek. A CSPG-ok közé tartoznak a lektikánok,

melyek egyszerre több ECM molekulához képesek kötődni (pl: HA, kötőfehérjék, tenaszcin). Emlősökben a lektikánok családjába soroljuk az aggregánt, a brevikánt, a neurokánt és a verzikánt. A lektikánok szerkezetének közös jellemzője egy hosszú, flexibilis, centralis fehérje jelenléte, melynek mindkét végén meglehetősen homológ felépítésű, globuláris domén található (G1, G3) (Mörgelin és mtsai., 1989). Az egyes lektikánok esetében a centralis fehérje mind méretében, mind a hozzá kapcsolódó glükózaminoglikán oldalláncok típusában különbözik. A glükózaminoglikán láncok esetenként hiányozhatnak vagy számuk meglehetősen redukált lehet. A glükózaminoglikán oldalláncok vonatkozásában kialakuló variációktól eltekintve egyéb izoformák is kialakulhatnak alternatív splicing révén, pl. a verzikán esetében, amelynek négy variánsa különböztethető meg: a V0, a V1, a V2 és a V3 (1. ábra) (Dours-Zimmermann és Zimmermann, 1994; Zimmermann és Ruoslahti, 1989).

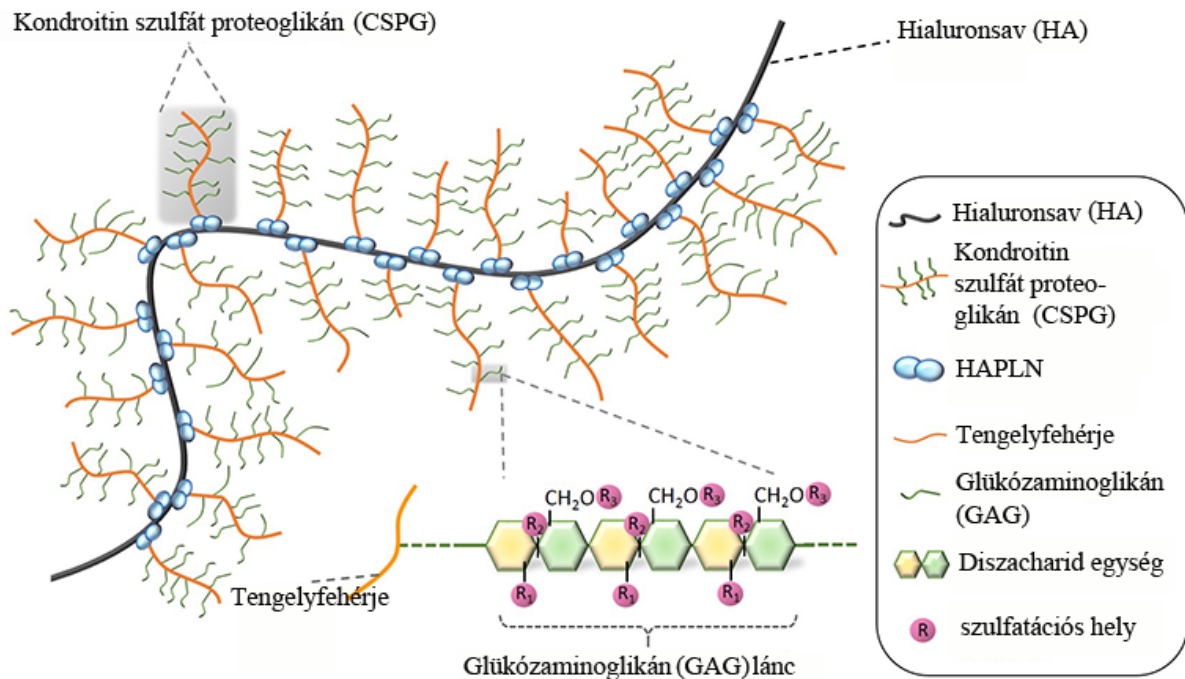


**1. ábra:** A lektikánok általános szerkezete. (Zimmermann és Dours-Zimmermann, 2008 után módosítva)

### 2.1.1.2. Hialuronsav

A HA a glükózaminoglikánok csoportjába tartozik, azonban nem kapcsolódik központi fehérjéhez (Toole, 2000, 2004). A HA glükuronsavat és N-acetil-glükózamint tartalmazó, ismétlődő diszacharid egységekből felépülő hosszú, lineáris polimer. Míg a központi fehérjéhez kapcsolódó glükózaminoglikánok szintézisében és modifikációjában glikozil - és szulfotranszferáz enzimek egész sora vesz részt, addig a szerkezetileg egyszerűbb HA szintéziséért egy transzmembrán enzim, a hialuronsav-szintáz felelős. Gerincesekben a hialuronsav-szintáznak három izotípusát azonosították (DeAngelis, 1999; Spicer és McDonald, 1998). A HA szintézise folyamatos, amely során a molekula benyúlik a

pericellularis térbe, mindeközben az enzimhez kötött állapotban marad (Spicer és Tien, 2004). Jelenlegi elképzeléseink alapján az ECM gerincét a HA képezi (Bandtlow és Zimmermann, 2000; Rauch, 2004). A HA a szintézise során először a különböző lektikánok G1 doménjével lép kapcsolatba, majd a kialakuló komplexet kötőfehérjék stabilizálják (2. ábra). Mivel a HA megtartja kapcsolatát az öt szintetizáló transzmembrán enzimmel, kulcsszerepet játszik a mátrixnak a sejtek köré történő szerveződésében.



**2. ábra:** A CSPG-ok sematikus ábrázolása és az általuk létrehozott makromolekuláris mátrix felépítése a központi idegrendszerben. HAPLN: hialuronsavhoz kapcsolódó kötőfehérje. (Vecino és Kwok, 2016 után módosítva)

### 2.1.1.3. Kötőfehérjék

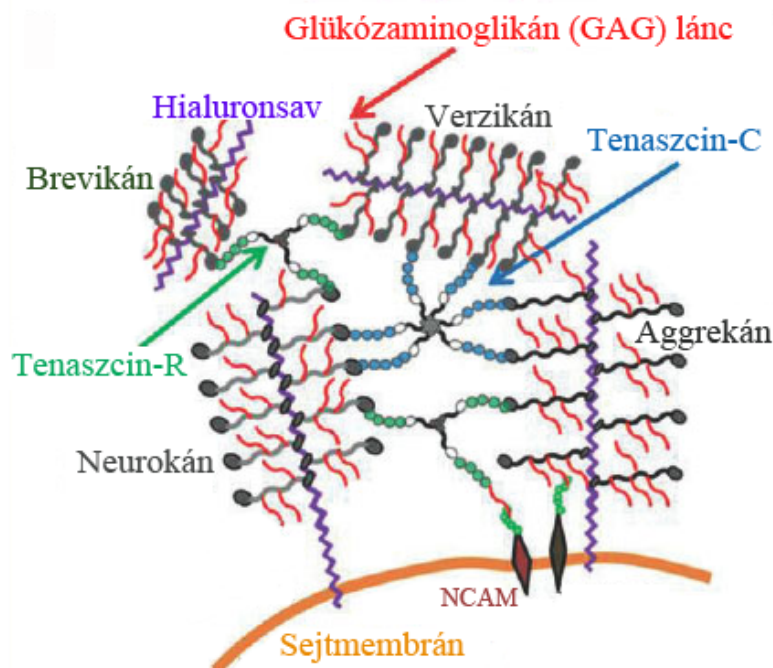
A központi idegrendszerben az ECM-ot felépítő molekulák harmadik nagy csoportját a kötőfehérjék képezik. Ide tartoznak a hialuronsavhoz kapcsolódó kötőfehérjék (HAPLN), amelyek a lektikánok és a HA közötti kapcsolatot stabilizálják (2. ábra) (Spicer és mtsai., 2003). A HAPLN-ek családjába négy molekula tartozik: a HAPLN1/Crt11, a HAPLN2/Bral1, a HAPLN3/Lp3 és a HAPLN4/Bral2, amelyek közül a központi idegrendszerben az 1-es, a 2-es és a 4-es típus fordul elő (Bekku és mtsai., 2003; Hirakawa és mtsai., 2000).

### 2.1.1.4. A tenasczin család tagjai

Emlősökben a tenasczin család tagjai közül öt molekula fordul elő: a tenasczin-C, -R, -X, -W és az -Y. A hat alegységből felépülő tenasczin-C és a trimer szerkezetű tenasczin-R

(TN-R) egyaránt képes kötődni az ECM egyéb komponenseihez, illetve sejt felszíni ligandokhoz (Jones és Jones, 2000). A sejt felszíni receptorok lehetnek integrinek, tartozhatnak a heparán szulfát proteoglikánok családjába (pl. szindekánok) és lehetnek az immunglobulinok szuperfamilájába tartozó sejtadhéziós molekulák.

A lektikánok G3 doménjükön keresztül egyetlen tenaszcin molekulával képesek kapcsolódni. Ily módon a TN-R három, a tenaszcin-C hat lektikánt köthet meg, mely révén hidat képeznek a szomszédos HA-lektikán-kötőfehérje komplexek között (3. ábra) (Zimmermann és Dours-Zimmermann, 2008).



**3. ábra:** A tenaszcin molekulák elhelyezkedése az ECM-ban. (Dembitskaya és mtsai., 2016 után módosítva)

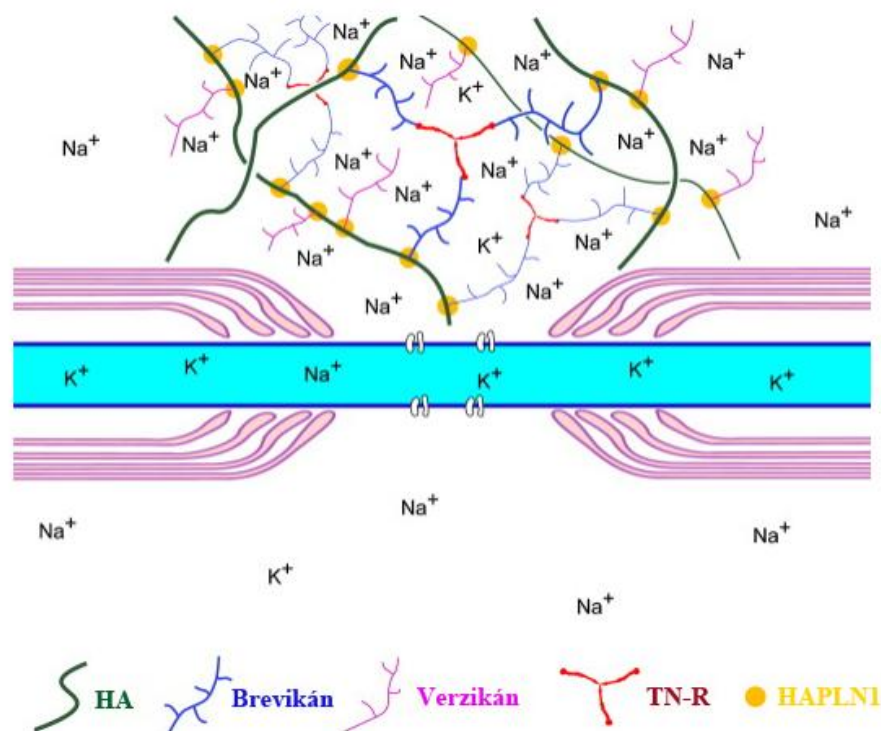
Mindkét molekula, a tenaszcin-C és a TN-R is, részt vesz a perineuronális háló (PNN) kialakításában, stabilizálva annak szerkezetét. TN-R knockout egereket vizsgálva, a PNN szerkezetében és összetételében bekövetkező rendellenes változások már a fejlődés korai stádiumában megjelennek és a postnatalis differenciáció alatt tovább fokozódnak (Brückner és mtsai., 2000). Mivel a TN-R elsődlegesen a PNN végleges szerkezetének kialakítása során tölt be lényeges szerepet, a TN-R knockout egereken történő vizsgálatok során a CSPG-ok abnormalis aggregációját figyelték meg (Carulli és mtsai., 2006; Galtrey és Fawcett, 2007).

### 2.1.2. Az ECM megjelenési formái és funkciója

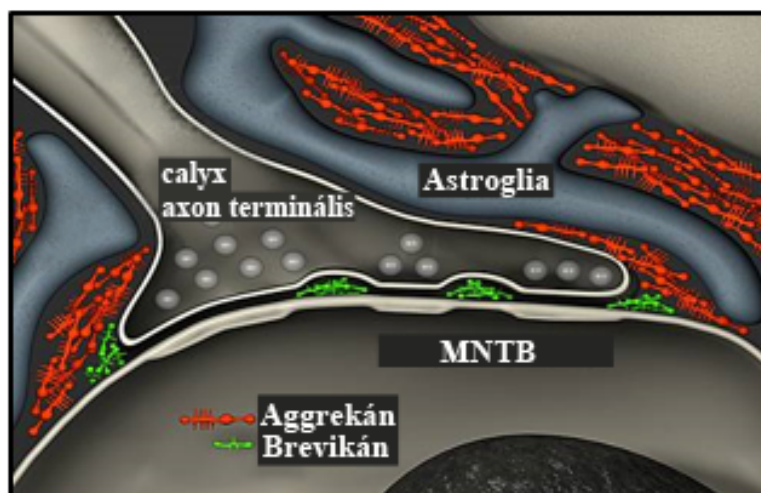
Az ECM-nek a központi idegrendszerben több megjelenési formája ismert. A molekulák diffúz hálózatot képezhetnek a neuropilben, illetve különböző neuronális struktúrák körül akkumulálódva, kondenzált megjelenési formákat alakíthatnak ki. A kondenzált megjelenési formáknak három fő változata ismert: (1) a perineuronális háló (PNN), mely a neuronok sejtteste, az axon initialis szegmentuma és a dendritek proximalis része körül szerveződő sűrű molekulaszövedék, (2) nodalis ECM a Ranvier-féle befűződések körül, (3) az axon terminálisokat behüvelyező, 'axonal coat' (AC) (Bekku és mtsai., 2009; Bekku és Oohashi, 2010; Brückner és mtsai., 2008; Deepa és mtsai., 2006; Zimmermann és Dours-Zimmermann, 2008). Az ECM különböző megjelenési formáinak molekuláris összetétele függ a neuronok funkciójától, összeköttetéseitől, morfológiai és neurokémiai sajátosságaitól (Brückner és mtsai., 2008; Matesz és mtsai., 2005; Mészár és mtsai., 2008; Morawski és mtsai., 2012; Rácz és mtsai., 2014; Szigeti és mtsai., 2006).

Mivel az ECM-et alkotó molekulák nagyszámú negatív töltéssel rendelkeznek, jelentős kation pufferelő kapacitásuk révén befolyásolják a sejtek élettani folyamatait, illetve erősen anionos környezetet kialakítva részt vesznek az extracellularis víz- és ionhomeosztázis szabályozásában (Hrabetova és mtsai., 2009). A polianionos környezet gátolja a kationok (a  $\text{Na}^+$  és a  $\text{K}^+$ ) szabad diffúzióját, illetve segíti a víz áramlását az extracellularis térben (Costa és mtsai., 2007). A Ranvier-féle befűződések körül kialakuló **nodalis ECM** főbb komponensei a HA, a brevikán, a verzikán, a TN-R és a HAPLN1 (4. ábra) (Cicanic és mtsai., 2012). Mivel az ECM diffúziós barriert képez a kationok számára, a lokálisan emelkedett  $\text{Na}^+$  ion koncentráció fenntartása révén feltételezhetően részt vesz a szaltatórikus ingerületvezetés szabályozásában.

Az **AC** kialakításában elsősorban az aggregán, a brevikán és a HAPLN1 vesz részt. Az aggregán és a brevikán eloszlási mintázata az axon terminálisok körül eltérő. A brevikán gyűrűszerű struktúrát kialakítva veszi körbe a synapticus rést és a synapticus részben is megtalálható, míg az aggregán a teljes axon terminálist és a postsynapticus sejtet behüvelyezi (5. ábra) (Blosa és mtsai., 2013; Gundelfinger és mtsai., 2010; Rácz és mtsai., 2014). Expressziós mintázatuk alapján feltételezhetjük, hogy az aggregán és a brevikán a synapsis szerkezetének stabilizálásában játszik szerepet, valamint diffúziós barriert képeznek a synapticus részben található molekulák számára.



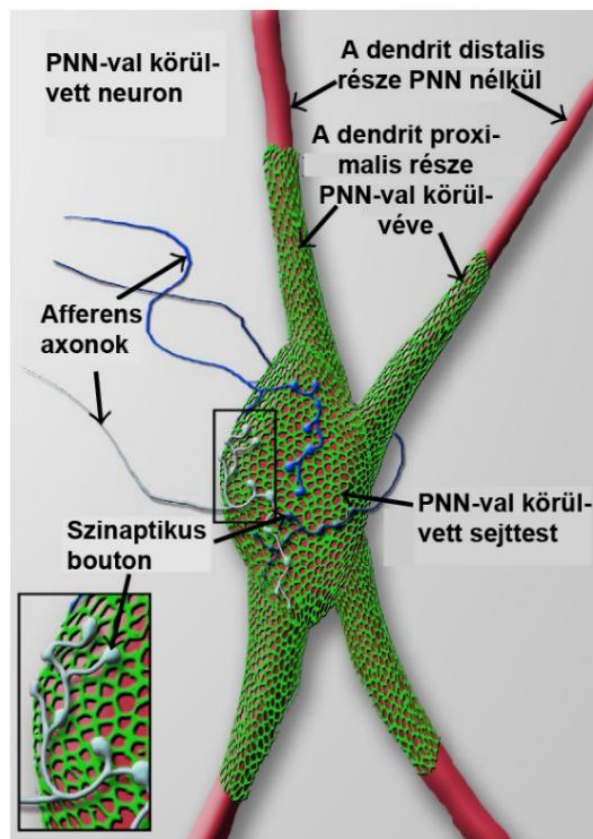
**4. ábra:** Az ECM szerkezete és molekuláris összetétele a Ranvier-féle befűződések körül. (Cicanic és mtsai., 2012 után módosítva)



**5. ábra:** Az aggrecán és a brevikan eloszlása a Held-féle kehelyben. A corpus trapezoideum medialis magjának (MNTB) minden fő sejtjén nagyméretű presynapticus glutaminerg axon terminális végződik, amelyeket Held-féle kehelynek neveznek. (Blosa és mtsai., 2013 után módosítva)

A PNN komponenseit neuronok és glia sejtek egyaránt termelik (Carulli és mtsai., 2006; Deepa és mtsai., 2006), összetétele és szerepe az idegrendszer fejlődése során változik. Az embrionalis korban megjelenő kezdetleges molekulaszövedék egyik lehetséges szerepe,

hogy összeköttetést létesít az extracelluláris tér és az intracelluláris citoskeleton között. A PNN-ben megjelenő proteoglikánok alacsony affinitású receptorként működve különböző neurotróp anyagok, pl. növekedési faktorok megkötésére képesek, így a PNN részt vehet a neuronok érésének szabályozásában, stimulálhatja az axon növekedését (Flaumenhaft és Rifkin, 1991). A juvenilis korban megjelenő PNN jellemző építőkövei a neurokán, a verzikán V1 és a TN-C, míg a felnőtt korban megfigyelhető PNN felépítésében a lektikán család tagjai, a HA, a TN-R és a HAPLN család tagjai vesznek részt (Carulli és mtsai., 2006; Galtrey és mtsai., 2008) (6. ábra).



**6. ábra:** Perineuronális hálóval (PNN) körülvett neuron. A sejttestet és a dendritek proximális részét PNN borítja (zöld), a dendritek distalis része nem rendelkezik ECM borítással. A PNN által szabadon hagyott résekben synaptikus boutonok láthatók. (de Winter, 2016 után módosítva)

Több kutatási eredmény alátámasztja az ECM és elsősorban a PNN szerepét a neuronális plaszticitásban, regenerációban, szignál transzdukciós folyamatokban, illetve a neuronok aktivitásának szabályozásában normál és patológiás körülmények között (Dityatev és Fellin, 2008; Härtig és mtsai., 1999; Kwok és mtsai., 2011; Morita és mtsai., 2010; Zimmermann és Dours-Zimmermann, 2008). A sejtfelszíni fehérjékhez kötődve részt vesz a membránfehérjék laterális diffúziójának szabályozásában, illetve a citoskeletonális vázzal való kapcsolata révén

jelentős szerepe van a sejtek mechanikai stabilitásának fenntartásában (Frischknecht és Seidenbecher, 2008; Gundelfinger és mtsai., 2010). Az ECM molekulái közül a CSPG-oknak (elsősorban brevikán, aggregán és verzikán) a synapticus átrendeződés szempontjából főleg gátló szerepet tulajdonítanak (Faissner és mtsai., 2010; Gundelfinger és mtsai., 2010; Zimmermann és Dours-Zimmermann, 2008), míg a HA, mint permisszív molekula, a fokozott synapticus átépülést mutató területeken expresszálódik jelentős mértékben. Mindezek mellett a CSPG-oknak a fémionok (Al, Fe, Cu) által okozott oxidatív stresszel szembeni védekezésben is jelentős szerepet tulajdonítanak (Cañas és mtsai., 2007; Morawski és mtsai., 2004).

### **2.1.3. Synapticus plaszticitás és az ECM**

Synapticus plaszticitás alatt a synapticus kapcsolatok újrendeződésének lehetőségét és dinamikájában bekövetkező változásokat értjük. Megkülönböztetünk 'short term' és 'long term' típusú synapticus plaszticitást. A 'short term' synapticus plaszticitás során a synapsis hatékonyságában átmeneti változások jelentkeznek. A synapticus kapcsolat átmeneti erősödését okozhatja a felszabaduló neurotranszmitter mennyiségének növekedése (Stevens és Wesseling, 1999), míg a synapsis gyengülése részben a vezikulák kimerülésének, részben a pre- és postsynapticus receptorok deszenzitizációjának tulajdonítható (Zucker és Regehr, 2002). Az intenzív synapticus aktivitás a synapsis hatékonyságában olyan változásokat indukálhat, amelynek hatása órákig, napokig, hónapokig is tarthat. A synapticus kapcsolat erősségében bekövetkező tartós változást 'long term' típusú synapticus plaszticitásnak nevezzük (Dityatev és Schachner, 2003).

Kezdetben, az ECM molekulákat a neuromuscularis junkciók alkotórészeként írták le, a presynapticus proteinek és a postsynapticus acetilkolin receptorok akkumulációjában tulajdonítottak nekik szerepet (Dityatev és Schachner, 2003). Az ECM molekulák synapticus kapcsolatokban betöltött szerepe iránti érdeklődés az 1980-as évek vége felé nőtt meg, amikor felnőtt egerekből származó hippocampusban és kisagyban számos olyan synapsist azonosítottak, amelyekben immunoreaktív, heparán szulfát proteoglikánnal asszociált, neuralis sejtadhéziós molekula (NCAM 180) volt megtalálható (Persohn és mtsai., 1989). További vizsgálatok során fény derült arra, hogy a központi idegrendszer sérülését követően kialakuló glia hegszövet fő komponenseit a CSPG-ok képezik (Rolls és mtsai., 2009). Ez a megfigyelés alátámasztja az ECM azon képességét, hogy molekuláris barriert képez a benövő axonok számára, ezáltal jelentős szerepet játszik a neuronális plaszticitás és a regeneráció

folyamatának szabályozásában. Ezen elméletre további bizonyítékul szolgált az a tény, hogy az ECM molekulák enzimatis emésztését követően az axon benövésre gyakorolt gátló hatás csökkent (McKeon és mtsai., 1995; Smith-Thomas és mtsai., 1995).

Az ECM megjelenési formái közül leginkább a PNN-nek tulajdonítanak jelentős szerepet a synapticus plaszticitás szabályozásában, melynek molekuláris összetétele az idegrendszer fejlődése során változik. A PNN bizonyos komponensei, pl. az aggregán, a postnatalis szinaptogenezist megelőzően expresszálódik, amely előre kijelölheti a későbbiekben kialakuló synapsisok helyét (Milev és mtsai., 1998; Popp és mtsai., 2003). A postnatalis időszakban a PNN komplexebbé válik és szorosan körbeveszi a neuronokat. A PNN érésével párhuzamosan a neuronok synapticus plaszticitásának csökkenése figyelhető meg (Pizzorusso és mtsai., 2002, 2006), az érett forma kialakulása a synapsisok stabilizációját támogatja. Patkányokban, a felnőtt állatokra jellemző PNN a korai postnatalis időszakban alakul ki, mely az ún. kritikus periódus lezárulását jelenti. A kritikus periódus alatt a sejtek közötti kapcsolatok folyamatos újrászerveződése zajlik. A PNN synapticus plaszticitásban betöltött szerepére vonatkozóan bizonyítékul szolgál az a kísérlet, amelynek során a gerincvelőt, léziót követően, kondroitináz ABC enzimmel való kezelésnek vetették alá. Az enzim, a sejtek körül akkumulálódó CSPG-ok lebontása által, a PNN szerkezetét megbontva, a sejtek számára lehetőséget nyújt újabb synapticus kapcsolatok kiépítésére, így a neuronok regenerációs képessége javul. Következésképpen, a PNN a synapticus transzmisszió során stabilizáló szerepet tölt be, a már meglévő kapcsolatokat erősíti, újabb synapsisok kialakulását gátolja (Dityatev és Schachner, 2003).

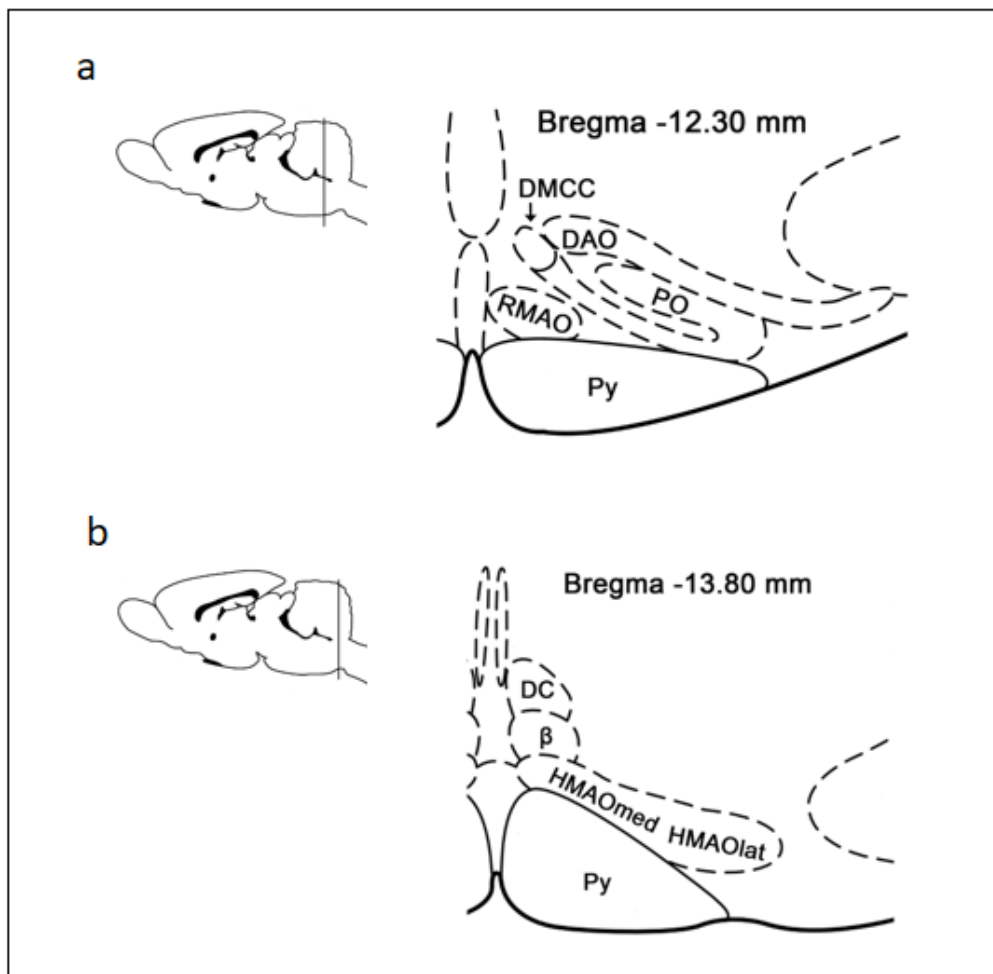
## 2.2. Nuclei precerebellares

A kisagy elsősorban a nagyagykéregből származó motoros parancsok és a gerincvelő felől érkező szenzoros információk összehangolását végzi. Ezen információk közvetett módon, az agytörzsben található precerebellaris magokon keresztül, moha- vagy kúszórostok közvetítésével érik el a kisagy területét. A precerebellaris magok csoportjába soroljuk az általunk vizsgált oliva inferior-t (OI) és a nucleus prepositus hypoglossi-t (PHN) is.

Munkacsoportunk figyelmének központjában a vestibularis magkomplex felépítésének és kapcsolatrendszernek vizsgálata áll, valamint annak feltárása, hogy a vestibularis magok területén megfigyelhető morfológiai és funkcionális különbségek mutatnak-e párhuzamot az ECM molekulák eloszlásával és szerveződésével (Rácz és mtsai., 2014). A vestibularis magokba érkező ingerület származhat a belső fülben található labirinthusból, illetve lehet visualis és proprioceptív eredetű. A vestibularis magokban történő komplex ingerület feldolgozást követően az információ direkt vagy indirekt úton elsősorban a szemmozgató, illetve gerincvelői motoneuronok felé továbbítódik, jelentős szerepet játszva ezáltal mozgás során az egyensúly megtartásában, illetve a szemmozgások koordinációjában (Brodal, 1984; McCrea és mtsai., 1987 a, b). Az indirekt transzmisszióban a precerebellaris magok közül elsősorban az OI-nak és a PHN-nak van kulcsfontosságú szerepe, melyek a kisagy aktivitásának szabályozásán keresztül látják el funkciójukat (Kitai és mtsai., 1977; McCrea és mtsai., 1977). Korábbi eredményeink alapján elmondható, hogy a vestibularis léziót és az ennek következményeként kialakuló testtartás- és szemmozgásbeli kompenzációs folyamatokat a vestibularis magok ECM mintázatában megfigyelhető változások kísérik, amely az ECM vestibularis plaszticitásban betöltött szerepét feltételezi (Deák és mtsai., 2012; Gaál és mtsai., 2014). Vestibularis léziót követően, a vestibularis magok és a precerebellaris magok közötti kiterjedt kapcsolat felveti az ECM mintázatában bekövetkező változás lehetőségét az OI és a PHN területén. Ahhoz, hogy a vestibularis léziót követően, a precerebellaris magok területén található ECM szerkezetében kialakuló eltéréseket megfigyeljük, elengedhetetlen az intakt magok ECM mintázatának ismerete. Az intakt és a vestibularis léziót követő állapot közötti különbségek feltárása segítséget nyújthat az ECM vestibularis kompenzációban betöltött szerepének megismerésében.

### 2.2.1. Oliva inferior

A nyúltvelő rostralis kétharmadában, a pyramisoktól lateralisán található orsó alakú kiemelkedést az oliva inferior (OI) hozza létre. Az OI, szerkezetét tekintve, három almagra osztható: principal olive (PO), dorsal accessory olive (DAO) és medial accessory olive (MAO)<sup>1</sup>. A három almagon kívül további, kisebb neuron csoportok figyelhetők meg az OI területén, melyek összeköttetések alapján a MAO részeinek tekinthetők: dorsal cap (DC), nucleus  $\beta$ , ventrolateral outgrowth (VLO) és dorsomedial cell column (DMCC) (7. ábra) (Azizi és Woodward, 1987; Gwyn és mtsai., 1977).

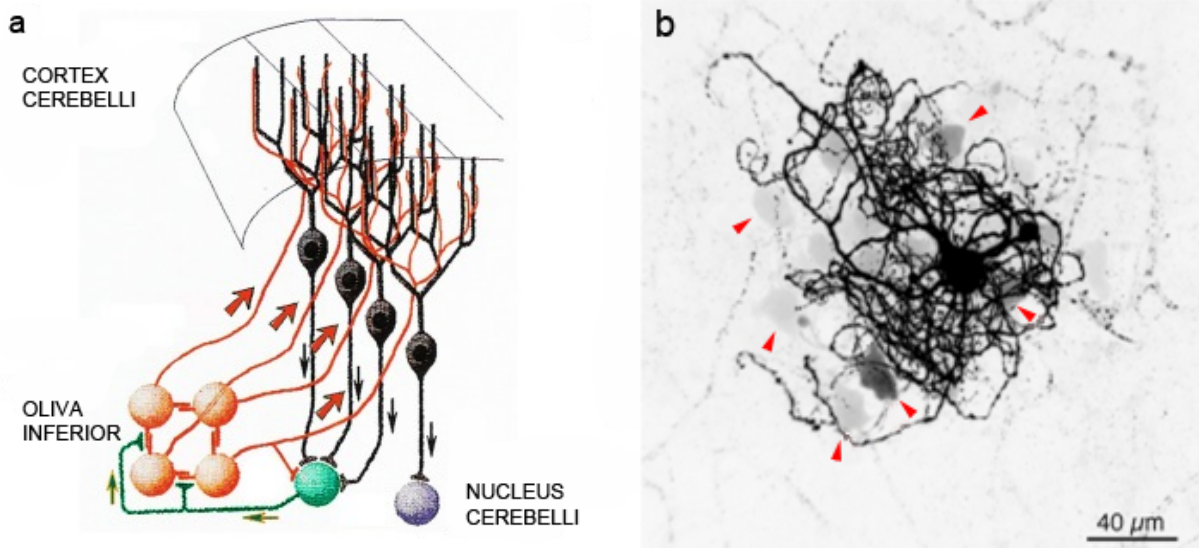


**7. ábra:** Az oliva inferior (OI) felépítése. (a) Az OI rostralis részén (Bregmától való távolság -12.30 mm) elkülöníthető aegységek. DMCC: dorsomedial cell column, DAO: dorsal accessory olive, PO: principal olive, RMAO: medial accessory olive - rostralis lamella, Py: pyramis. (b) Az OI caudalis részén (Bregmától való távolság -13.80 mm) elkülöníthető aegységek. DC: dorsal cap,  $\beta$ : nucleus  $\beta$ , HMAOmed: horizontal medial accessory olive - medialis lamella, HMAOlat: horizontal medial accessory olive - lateralis lamella, Py: pyramis. (Paxinos és Watson, 1998 után módosítva)

<sup>1</sup> Az almagok elnevezése az angol nevezéktan alapján történt.

Funkcionálisan az OI-on belül somatosensoros, visuomotoros-vestibularis és integratív sejtcsoportok különíthetők el (De Zeeuw és mtsai., 1998; Gwyn és mtsai., 1977), melyek sejtjei jellegzetes topográfiai elrendeződést mutatnak (Azizi és Woodward, 1987; Brown, 1980; De Zeeuw és mtsai., 1994). A somatosensoros sejtek, melyek az egyensúly, illetve a testtartás szabályozásában vesznek részt, a DAO területén és a MAO horizontális lamellájában találhatóak. A visuomotoros-vestibularis sejtcsoport a DMCC, DC és nucleus  $\beta$  almagok területét fedi le, elsősorban a koordinált szemmozgások és az axialis izomműködés szabályozásában van szerepük. Az integratív sejtcsoportok a MAO rostrális lamelláját és a PO területét foglalják el, a célorientált mozgások és a végtagmozgások kivitelezésében játszanak szerepet.

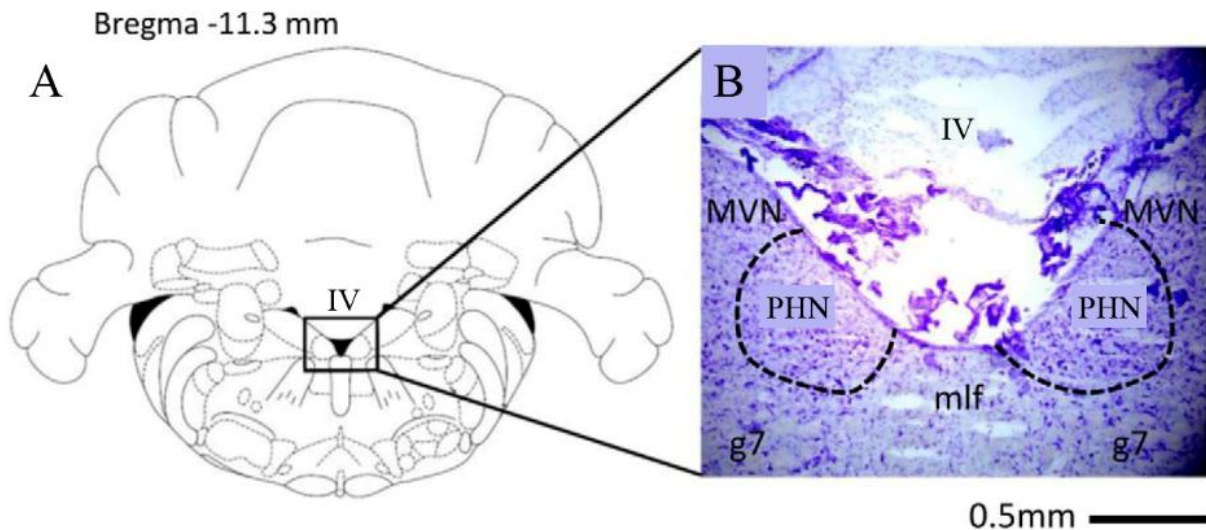
Az OI sejtjei morfológiailag egységes populációt képeznek (De Zeeuw és mtsai., 1998; Gwyn és mtsai., 1977). Az itt található neuronok 2-7 dendrittel rendelkeznek, melyek a sejttesttől 10-20  $\mu\text{m}$  távolságban oszlanak el. A sejttest és a dendritek proximalis részének felszínén synapsisok ritkán figyelhetők meg, többnyire a dendritek distalis részén látható glomerulusok területén fordulnak elő (De Zeeuw és mtsai., 1998; Gwyn és mtsai., 1977). Az OI szomszédos neuronjai közötti gap junction kapcsolatok jelentik a kommunikáció kizárólagos formáját (8. b ábra) (Hoge és mtsai., 2011), egyetlen OI neuron 500-1000 gap junction kialakítására képes. Az OI-ból kiinduló tractus olivocerebellaris rostjai a kisagykéreg különböző területeihez futnak és mint kúszórostok aktiválják a Purkinje sejteket, illetve axon kollateralisok révén egyes kisagyi magok neuronjaival is serkenő kapcsolatot alkotnak (8. a ábra) (Llinás, 2014). A Purkinje sejtek gátló synapsisokat képeznek a kisagyi magok neuronjaival. A kisagyi magok területén található serkentő neuronok az agytörzsben, a thalamusban és a gerinvelőben végződnek, míg a gátló neuronok az OI centrolateralis részével állnak kapcsolatban (De Zeeuw és mtsai., 1990; Medina és mtsai., 2002).



**8. ábra: Az oliva inferior kapcsolatai.** (a) Az OI sejteinek axonjai (*narancssárga*), mint kúszórostok, aktiválják a Purkinje sejteket (*fekete*), illetve axonkollaterálisok révén olyan kisagyi magok (*zöld*) neuronjaival képeznek serkentő synapsisokat, melyek visszacsatolással az OI neuronjainak aktivitását szabályozzák. (Llinás, 2014 után módosítva) (b) Neurobiotinnal jelölt OI sejt. A *nyilak* a dendritfa közelében látható, gap junction-okon keresztül jelölődött neuronok sejttesteit mutatják. (Hoge és mtsai., 2011 után módosítva)

### 2.2.2. Nucleus prepositus hypoglossi

A nucleus prepositus hypoglossi (PHN) a nucleus hypoglossus felső pólusától rostralisán található agytörzsi precerebellaris mag, amely a negyedik agykamra fekéén, a nucleus vestibularis medialishoz (MVN) képest medialisán, a nervus facialis térdéhez közel helyezkedik el (9. ábra) (Butler és Taube, 2015; Fukushima és Kaneko, 1995; McCrea és Baker, 1985; McCrea és Horn, 2006).



**9. ábra:** A nucleus prepositus hypoglossi (PHN) lokalizációjának bemutatása sematikus ábrán (A) és szövettani metszeten (B). *mlf*: fasciculus longitudinalis medialis, *MVN*: nucleus vestibularis medialis, *PHN*: nucleus prepositus hypoglossi, *IV*: IV. agykamra, *g7*: geniculum nervi facialis. A szaggatott vonal a PHN hozzávetőleges határát mutatja. (Butler és Taube, 2015 után módosítva)

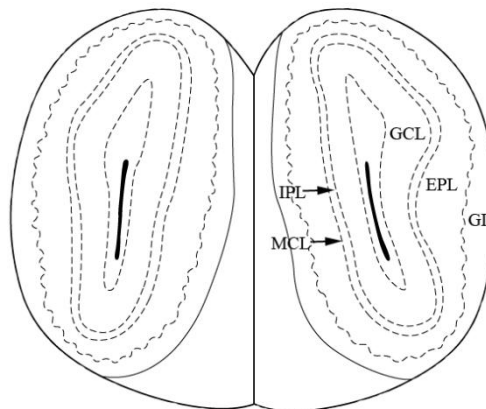
A PHN sejtjei a sejttest mérete, elhelyezkedése és a dendritfa elágazódása alapján három csoportba sorolhatók. A PHN caudalis részének ventromedialis területén dominánsan 30-45  $\mu\text{m}$  átmérővel rendelkező, nagyméretű sejtek találhatóak, melyek dendritjei behálózják a sejttestek közötti területet. A mag caudalis részének dorsolaterális régiójában elsősorban kisebb, 10-20  $\mu\text{m}$  átmérőjű sejteket láthatunk, melyek dendritjei szintén lokálisan ágazódnak el. Míg a nagyobb méretű sejtek axonjai kollaterálisokat nem képeznek, addig a kisebb méretű neuronok gyakran adnak a PHN-en belül végződő axonkollaterálisokat. A PHN sejtjeinek harmadik csoportját közepes méretű, 20-35  $\mu\text{m}$  átmérőjű neuronok alkotják, melyek a mag teljes területén megtalálhatók. Ezen sejtek az előző két csoport tagjaival ellentétben kisebb számú, de hosszabb lefutású dendritekkel rendelkeznek, melyek többnyire a nucleuson kívül végződnek. Ezen, ún. fő sejtek axonjai gyakran képeznek kollaterálisokat, amelyek egyaránt végződhetnek az ipsilaterális és a contralaterális nucleus prepositus hypoglossiban. A PHN

caudalis részének elsősorban kisméretű sejteket tartalmazó, dorsolateralis régióját parvocellularis almagnak, míg a főként nagyméretű neuronokat tartalmazó, ventromedialis részt magnocellularis almagnak nevezzük. A fennmaradó területeken dominánsan a közepes mérettartományba eső sejtek fordulnak elő (McCrea és Baker, 1985).

Funkcióját tekintve a PHN a látó és a vestibularis rendszer közötti kapcsolat kialakításában játszik szerepet. Neuronjai egyaránt lehetnek serkentő, illetve gátló sejtek (Idoux és mtsai., 2006; Kolkman és mtsai., 2011; Shino és mtsai., 2008). A PHN afferens kapcsolatai között az agytörzs és a kisagy több olyan területe szerepel, amelyek a szem és/vagy fejmozgások koordinálásában játszanak szerepet: ipsi- és contralateralis PHN és nucleus intercalatus, nucleus vestibularis (medialis, inferior és ventrolateralis), formatio reticularis pontis paramediana, formatio reticularis medulla oblongata, cortex cerebelli (flocculus, paraflocculus, crus I). A PHN efferens kapcsolatban áll minden olyan agytörzsi régióval, amely részt vesz a horizontális szemmozgások koordinációjában, illetve a verticalis és ferde szemmozgások kivitelezésében: nucleus vestibularis (medialis, inferior és ventrolateralis), OI (contralateralis DC és ipsilateralis MAO nucleus  $\beta$  része), formatio reticularis pontis paramediana, formatio reticularis medulla oblongata, contralateralis colliculus superior és preectum, contralateralis nucleus abducens és ipsilateralis nucleus oculomotorius, nucleus geniculatus lateralis ventralis, nucleus thalamicus centralis lateralis (McCrea és Baker, 1985).

### 2.3. Bulbus olfactorius

A szaglórendszer a környezetünkben lévő szagok/illatok monitorozása által nagymértékben befolyásolja a szociális viselkedésünket. A szaglóhámában lévő érzékszerek felszínén számos receptor található, melyek nagy affinitással kötik meg a környezetünkben lévő, számukra specifikus molekulákat. Az érzékszerek centralis nyúlványai a bulbus olfactorius (BO) glomerulusaiban végződnek, majd különböző típusú interneuronokból álló, bonyolult hálózatok közvetítik a beérkezett információt azon efferens neuronok felé, melyek a szaglókéreggel állnak kapcsolatban. A BO lamináris szerkezetű struktúra, így számos, egymással párhuzamos rétegre osztható, melyeken belül különböző típusú neuronokat azonosíthatunk. A neuronok csoportosítása leggyakrabban a sejttestük lokalizációja alapján történik (Kosaka és mtsai., 1998; Nagayama és mtsai., 2014; Pinching és Powell, 1971a). A külső felszín felől a mélyebb régiók felé haladva a következő rétegeket különíthetjük el: glomerularis réteg (GL), külső plexiform réteg (EPL), mitralis sejtek rétege (MCL), belső plexiform réteg (IPL), granularis sejtek rétege (GCL) (10. ábra).



**10. ábra:** A bulbus olfactorius szerkezetének sematikus ábrázolása, keresztmetszeti kép. *GL*: glomerularis réteg, *EPL*: külső plexiform réteg, *MCL*: mitralis sejtek rétege, *IPL*: belső plexiform réteg, *GCL*: granularis sejtek rétege. (Paxinos és Watson, 1998 után módosítva)

A BO különböző rétegeinek kialakításában számos sejtípus vesz részt. Megtalálhatók projekciós neuronok: mitralis sejtek és pamacsos sejtek. Interneuronok közül a következők azonosíthatók: periglomerularis sejtek, külső pamacsos sejtek, short axon sejtek, granularis sejtek, Van Gehuchten sejtek és Blanes sejtek. Jellemző glia sejtek: astrocyta, oligodendrocyta, olfactory ensheathing sejtek, NG2 és mikroglia (Figueres-Oñate és mtsai., 2014).

### 2.3.1. Glomerularis réteg

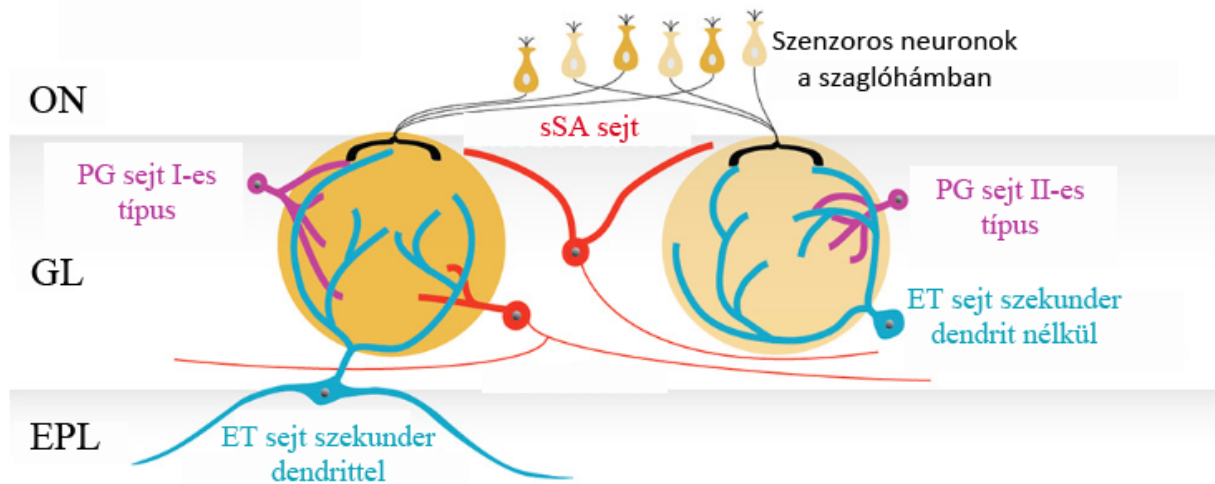
A legfelszínebben elhelyezkedő GL jellemző struktúrái a glomerulusok, melyek átmérője 80-160  $\mu\text{m}$  közötti tartományba esik. Szerkezeti felépítésükre jellemző a centralisan elhelyezkedő neuropil, amelyet a juxtaglomerularis sejtek csoportja vesz körül (Kosaka és Kosaka, 2011, 2016; Nagayama és mtsai., 2014). A juxtaglomerularis sejtek közé tartoznak a periglomerularis sejtek, a külső pamacsos sejtek, illetve a felszínes short axon sejtek (11. ábra). Habár a BO területén léteznek olyan interneuronok, amelyek axonjaikat az agy BO-on kívüli, úgynevezett extrabulbaris területeire küldik (Brunjes és mtsai., 2005; Eyre és mtsai., 2008), a juxtaglomerularis interneuronok nem projiciálnak ezen régiókba.

A GL sejtjei közül legnagyobb számban a **periglomerularis sejtek** fordulnak elő (Parrish-Aungst és mtsai., 2007). Dendritjeik többnyire monoglomerularis végződést mutatnak (egyetlen glomerulussal állnak kapcsolatban), ahol a glomerulusnak csak kis területét foglalják el (Nagayama és mtsai., 2014). A periglomerularis sejtek hat különböző kémiai hírvivőt termelnek, amelyek közül négy (GABA, dopamin, enkephalin, thyreotrop-releasing hormone-TRH) a neuroaktív anyagok csoportjába, kettő (calretinin, calbindin) pedig a kalcium-kötő fehérjék csoportjába tartozik (Kosaka és mtsai., 1998).

A **külső pamacsos sejtek** a pamacsos sejtek egy csoportját alkotják. A pamacsos sejteken belül a sejttestek lokalizációja alapján három alcsoportot különíthetünk el: felszínes, intermedier és belső pamacsos sejtek (Imai, 2014; Nagayama és mtsai., 2014). A külső pamacsos sejtek a felszínes pamacsos sejteknek felelnek meg, míg a másik két pamacsos sejt típus az EPL-ben található. A juxtaglomerularis sejtek közül a külső pamacsos sejtek rendelkeznek a legnagyobb sejttesttel (10-15  $\mu\text{m}$ ) (Pinching és Powell, 1971 a). Primer dendritjeik jellemzően monoglomerularis végződést mutatnak, azonban előfordulhatnak olyan külső pamacsos sejtek, amelyek dendritje két glomerulussal áll kapcsolatban (Ennis és Hayar, 2008). A külső pamacsos sejtek dendritjei, összehasonlítva a periglomerularis sejtek esetében leírtakkal, intraglomerularisan nagyobb területet fednek le. Rendelkezhetnek szekunder dendritekkel, amelyek megléte vagy hiánya alapján a külső pamacsos sejtek eltérő lokalizációt mutatnak: a szekunder dendrittel rendelkező sejtek esetében a sejttest a GL alsó egyharmadában vagy az EPL felszínes rétegében található, míg a szekunder dendrittel nem rendelkező sejtek somaja kizárólag a GL-ben helyezkedik el (11. ábra) (Macrides és Schneider, 1982; Schoenfeld és mtsai., 1985).

A **felszínes short axon sejtek** gömbölyű sejttestükről és kis mennyiségű citoplazma által körülvett, halványan festődő magjukról ismerhetők fel. A sejtek dendritjei az

interglomerularis térben futnak (Pinching és Powell, 1971 a, c). Axonjaik általában rövidek, 1-2 glomerulust felölelő távolságot hidalnak át. Mivel egy glomerulus átmérője 50-120  $\mu\text{m}$  közé tehető, ezért az axonok hossza hozzávetőlegesen 50 és 240  $\mu\text{m}$  közé esik (Pinching és Powell, 1971 a, b, c). Azonban a felszínes short axon sejtek egy másik csoportja 1mm távolságot is átérő axonnal rendelkezik és akár 50 glomerulussal is kapcsolatba kerülhetnek (11. ábra) (Nagayama és mtsai., 2014).

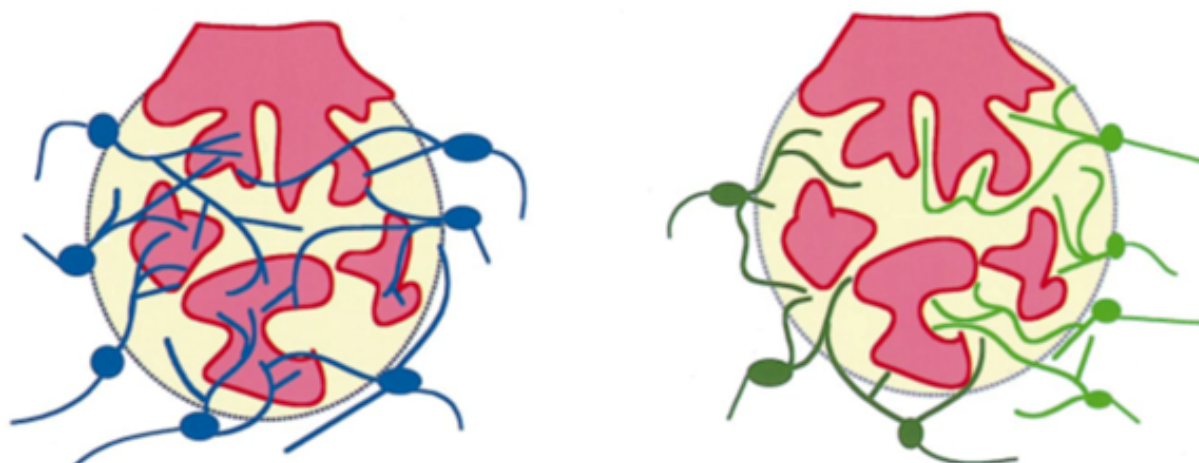


**11. ábra:** A glomerularis rétegben előforduló sejtek sematikus ábrázolása. *ON*: a nervus olfactorius rétege, *GL*: glomerularis réteg, *EPL*: külső plexiform réteg, *PG sejt*: periglomerularis sejt, *ET sejt*: külső pamacsos sejt, *sSA sejt*: felszínes short axon sejt. (Nagayama és mtsai., 2014 után módosítva)

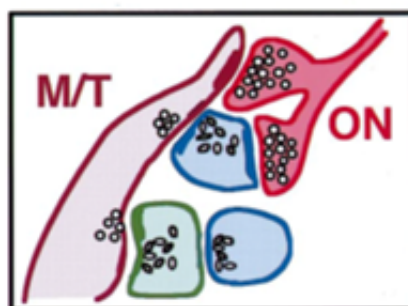
A glomerulusok körül **glia sejtek** is megfigyelhetők. Intraglomerularisan a glia sejtek nyúlványai által határolt, kisebb, szigetszerű kompartmentek különíthetők el (Shipley és mtsai., 2004). Megkülönböztetünk 'ON' és 'non-ON' zónákat (12. ábra). Az 'ON' zónában a szaglóhám szenzoros sejtjei alakítanak ki axo-dendritikus synapsisokat a célsejtjeikkel, míg a 'non-ON' zónában az interneuronok között jönnek létre dendro-dendritikus synapticus kapcsolatok (Kosaka és Kosaka, 2005).

A periglomerularis sejtek két típusa különböztethető meg dendritjeik intraglomerularis lefutása alapján. Az 1-es típusú periglomerularis sejtek dendritjei a glomerulus mindkét kompartmentjébe ('ON' és 'non-ON') belépnek, ezért axo-dendritikus és dendro-dendritikus synapsisok kialakítására egyaránt képesek, míg a 2-es típusú periglomerularis sejtek dendritjei a 'non-ON' kompartmentekben végződve, kizárólag dendro-dendritikus synapticus kapcsolatok kialakításában vesznek részt (12. ábra) (Kosaka és mtsai., 1998).

a.



b.



**12. ábra:** (a) Az 1-es és 2-es típusú periglomerularis (PG) sejtek sematikus ábrázolása. Az 1-es típusú periglomerularis sejtek (kék) dendritjei az 'ON' (piros) és a 'non-ON' (sárga) zónákba egyaránt belépnek, míg a 2-es típusú periglomerularis sejtek (zöld) dendritjei csak a 'non-ON' (sárga) zónában található meg. (b) Az 1-es és 2-es típusú periglomerularis sejtek intraglomerularis synapticus kapcsolatai. A nervus olfactorius (ON, piros) axonjai a mitralis vagy a pamacsos (M/T) sejteken (lila), illetve az 1-es típusú periglomerularis sejteken (kék) végződnek. Az 1-es és a 2-es típusú periglomerularis sejtek (zöld) a mitralis és a pamacsos sejtek apicalis dendritjeivel reciprok és egyirányú synapsisok kialakítására is képesek. (Kosaka és mtsai., 1998 után módosítva)

### 2.3.2. Külső plexiform réteg

Az EPL-ben elsődlegesen előforduló neuronális elemek: az M, a T és a granularis sejtek dendritjei, illetve a pamacsos sejtek axonjai. A sejttestek többsége a **pamacsos sejtek** csoportjába tartozik. A réteg felszínesebb régiójára az intermedier (középső) pamacsos sejtek jellemzők, a mélyebb zónákban az ún. belső pamacsos sejtek található meg (14. ábra) (Nagayama és mtsai., 2014; Orona és mtsai., 1984).

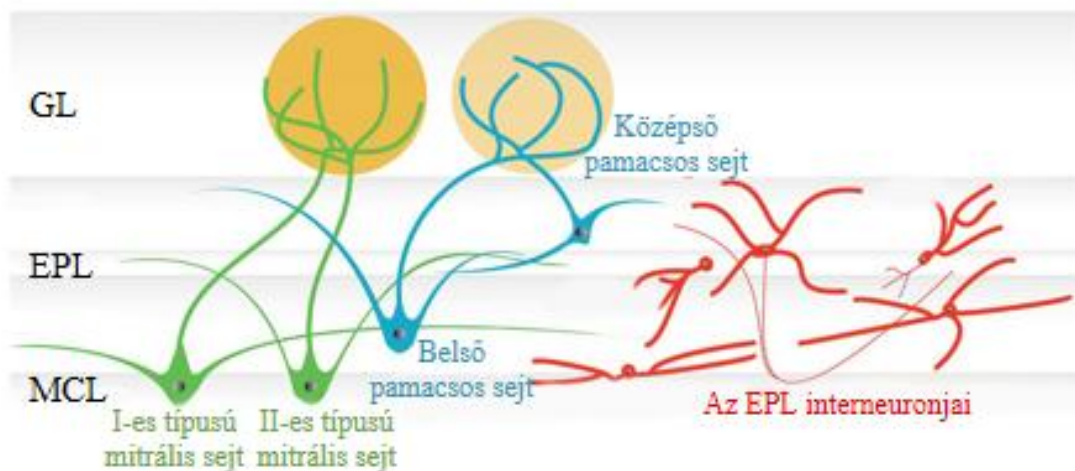
### 2.3.3. Mitralis sejtek rétege

A mitralis sejtek rétegében a **mitralis sejtek** sejtteste láthatók. A mitralis sejtek az embrionális fejlődés során még számos differenciálatlan dendrittel rendelkeznek, amelyek különböző glomerulusokkal állnak kapcsolatban. Az embrionális fejlődés későbbi szakaszában a differenciálatlan dendritek visszahúzódnak a GL-ből egy kivétellel, amelyből a mitralis sejt primer dendritje alakul ki. A korai postnatalis időszakban az embrionális primer dendritekből szekunder (lateralis) dendritek alakulnak ki, amelyek az EPL különböző területeivel állnak kapcsolatban (13. ábra) (Malun és Brunjes, 1996).



**13. ábra:** A primer és a szekunder dendritek kialakulása a mitralis sejtek fejlődése során (Imai, 2014 után módosítva).

A mitralis sejteket szekunder dendritjeik lefutása és a sejttestük alakja alapján különböző csoportokba sorolhatjuk. Az I-es típusú sejtek közé tartoznak azon mitralis sejtek, amelyek szekunder dendritjei az EPL mélyebb rétegeiben végződnek (Mori és mtsai., 1983; Orona és mtsai., 1984), míg a II-es típusú mitralis sejtek szekunder dendritjei az EPL intermedier zónájában érnek véget (14. ábra) (Mouradian és Scott, 1988; Orona és mtsai., 1984).



**14. ábra:** A mitralis sejtek rétegében (MCL) és a külső plexiform rétegben (EPL) található sejtek sematikus ábrázolása. GL: glomerularis réteg (Nagayama és mtsai., 2014 után módosítva).

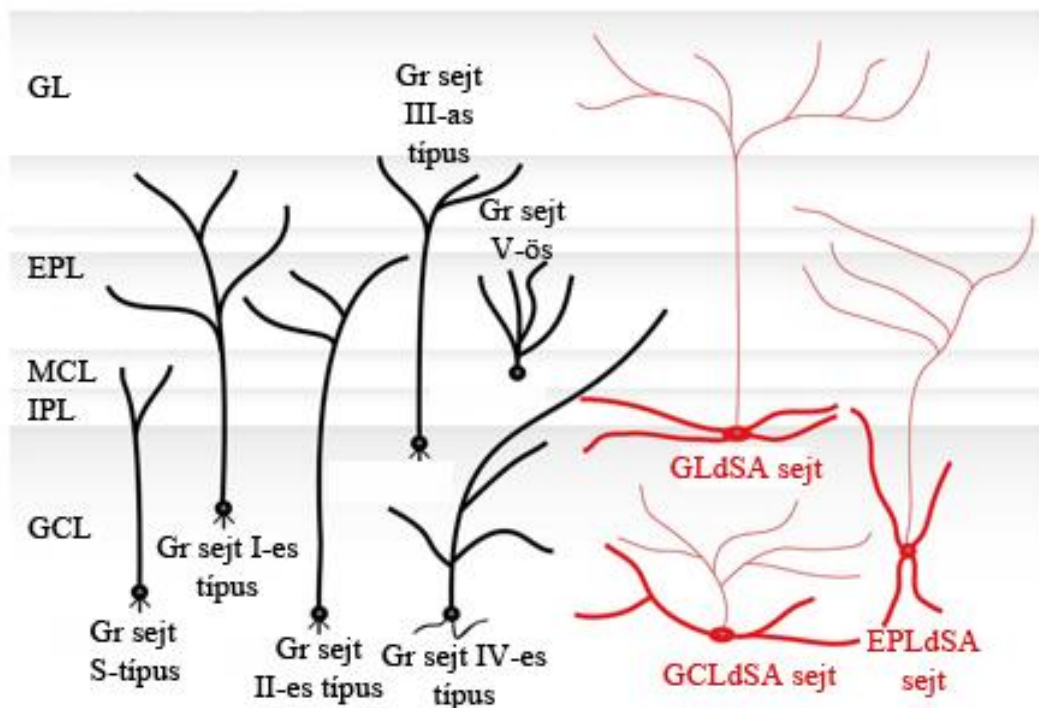
A sejtest alakja alapján három típusukat különböztethetjük meg: lehetnek háromszög, ovális és orsó alakúak (Kikuta és mtsai., 2013). A mitralis sejtek axonjai a pamacsos sejtek axonjaival együtt kötegekbe rendeződve hozzák létre a tractus olfactoriust (Imai, 2014; Nieuwenhuys és mtsai., 1998). A pamacsos sejtekhez hasonlóan, a mitralis sejtek axonkollaterálisok révén synapticus kapcsolatokat létesítenek a granularis sejtekkel és a mélyebben elhelyezkedő interneuronokkal.

#### 2.3.4. Belső plexiform réteg

Az IPL-ben a mitralis és pamacsos sejtek axonjain kívül néhány granularis sejt apicalis dendritje látható, illetve elszórtan a deep short axon (dSA) sejtek egy altípusa, a **GLdSA** fordul elő, melyek axonja az EPL-en áthaladva eléri a GL-t (15. ábra) (Eyre és mtsai., 2008; Nagayama és mtsai., 2014).

#### 2.3.5. Granularis sejtek rétege

A GCL meglehetősen heterogén morfológiai karakterrel bíró interneuronokat, elsősorban granularis sejteket és deep short axon sejteket tartalmaz (15. ábra).



**15. ábra:** A granularis sejtek rétegének (GCL) sematikus ábrázolása. GL: glomerularis réteg, EPL: külső plexiform réteg, MCL: mitralis sejtek rétege, IPL: belső plexiform réteg, GCL: granularis sejtek rétege, Gr sejt: granularis sejt, dSA: deep short axon sejt. (Nagayama és mtsai., 2014 után módosítva)

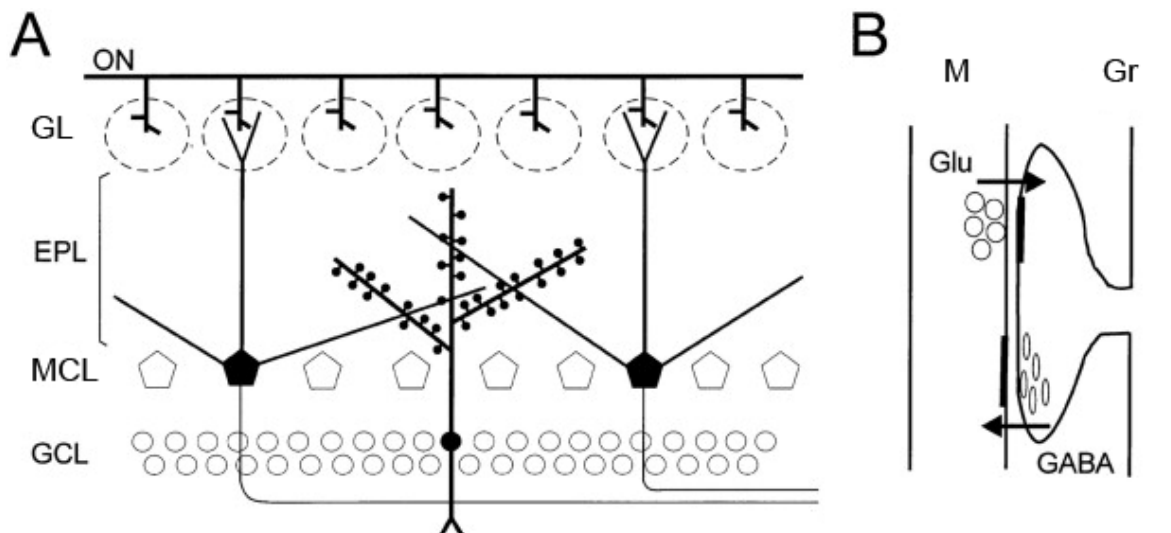
A **granularis sejtek** axon nélküli sejtek, megjelenésükre általánosan jellemző a kisméretű sejttest, valamint megfigyelhető, hogy az apicalis dendritjeik a BO felszínére merőlegesen haladnak és többnyire az EPL-ben végződnek. A granularis sejtek alcsoportokba történő besorolása a sejttestük lokalizációja, illetve a dendritek lefutása alapján történik (15. ábra) (Merkle és mtsai., 2014; Nagayama és mtsai., 2014).

A **deep short axon sejtek** kategorizálásához az axonok disztribúcióját vették alapul. Az axontermináció alapján GLdSA, EPLdSA és GCLdSA sejteket különböztethetünk meg (15. ábra) (Eyre és mtsai., 2008).

### 2.3.6. A BO és a synapticus plaszticitás

A szaglásból származó információ feldolgozása egy meglehetősen bonyolult hálózaton keresztül valósul meg. A szaglóhám felépítésében részt vevő szenzoros neuronok a felszínükön expresszált receptorok révén a környezetben fellelhető illatanyagok monitorozását végzik. A szagmolekulák megkötése után, axonjaik révén, az ingerületet a BO-ba továbbítják, ahol célsejtjeikkel synapticus kapcsolatokat létesítenek. A szaglóhám szenzoros neuronjai felszínükön egyetlen receptor típust expresszálnak, és az azonos receptort hordozó neuronok axonjai egy adott glomerulusba konvergálnak (Mombaerts és mtsai., 1996; Ressler és mtsai., 1994). A szenzoros neuronok axonjai a glomerulusok 'ON' kompartmentjein belül axo-dendritikus synapsisokat alakítanak ki különböző postsynapticus sejtekkel, amelyek lehetnek mitralis sejtek, pamacsos sejtek, illetve 1-es típusú periglomerularis sejtek. A 'non-ON' régiókra jellemző dendro-dendritikus synapsisok interneuronok között alakulnak ki (12. b ábra) (Kosaka és mtsai., 1998). Dendro-dendritikus synapsisok kialakulása figyelhető meg az EPL-ben a mitralis és pamacsos sejtek szekunder dendritjei, illetve a granularis sejtek dendritjei között.

A szaglásból származó információ feldolgozásában jelentős szerepet tulajdonítanak az ún. reciprok synapsisoknak, amelyekre példaként említhető a mitralis sejtek szekunder dendritjei és a granularis sejtek dendritjei között kialakuló dendro-dendritikus synapticus kapcsolat. Ezen synapsisokban a glutamátot felszabadító mitralis sejt serkenti a granularis sejteket, amely GABAerg gátló impulzust küld a mitralis sejthez (16. ábra) (Isaacson és Strowbridge, 1998). A BO neuronjai által alkotott komplex hálózat az ingerület feldolgozása után az információt a mitralis sejtek és a pamacsos sejtek axonjaiból összeszedődő tractus olfactorius révén a szaglókéregbe juttatja (Figueres-Oñate és mtsai., 2014).



**16. ábra:** Dendro-dendritikus gátlás patkány bulbus olfactoriusban. (A) A BO rétegeinek sematikus ábrázolása. *GL*: glomerularis réteg, *EPL*: külső plexiform réteg, *MCL*: mitralis sejtek rétege, *GCL*: granularis sejtek rétege, *ON*: nervus olfactorius. (B) A mitralis és a granularis sejtek dendritjei között kialakuló reciprok synapsis sematikus ábrázolása. *M*: mitralis sejt, *Gr*: granularis sejt. (Isaacson és Strowbridge, 1998 után módosítva)

A BO synapticus plaszticitás szempontjából az agy kitüntetett területét képviseli, hiszen neuronális hálózata folyamatosan átépülő rendszert képez. Ez az élethosszig tartó átszerveződés két mechanizmuson keresztül valósul meg: (1) a szaglóhámában lévő érzéksejtek folyamatosan megújulnak és benövő axonjaik a glomerulusok már meglévő neuronális hálózatába integrálódnak, melyet ugyanazon szagló receptort expresszáló neuroepithel sejtek axonjai alkotnak (Lledo és Saghatelyan, 2005; Ma és mtsai., 2017), (2) a BO neuronális hálózatába folyamatosan épülnek be a subventricularis zónából származó, újonnan képződő neuronok (Luskin, 1993). Ezen folyamatok igen magas fokú plaszticitást biztosítanak a szaglórendszer számára, bár a háttérben álló molekuláris mechanizmusok részleteikben nem ismertek.

## 2.4. Célkitűzés

Mivel az irodalmi adatok és korábbi vizsgálataink is azt sugallják, hogy az ECM molekulák jelenléte, illetve hiánya jelentős mértékben befolyásolja a központi idegrendszer synapticus plaszticitását és regenerációját (Brückner és mtsai., 2008; Celio és mtsai., 1998; Dityatev és Fellin, 2008; Faissner és mtsai., 2010; Fawcett, 2015; Kwok és mtsai., 2011), ezért jelen munkánk során célul tűztük ki ezen molekulahálózat összetételének pontos feltérképezését három olyan agyterületen, amelyek fokozott synapticus plaszticitással rendelkeznek. Vizsgálatainkat patkányokon végeztük.

**1.** Kísérleteink első szakaszában két precerebellaris mag, az OI és a PHN területét tanulmányoztuk, amelyek kiterjedt kapcsolatban állnak a munkacsoportunk által részletesen vizsgált és igen magas fokú plaszticitással rendelkező vestibularis rendszerrel (Deak és mtsai., 2012; Rác és mtsai., 2014).

**a.** Az OI kapcsán felmerül a kérdés, hogy az ECM molekulák eloszlási mintázata követi-e az almagok funkcionális heterogenitását, vagy az egységes morfológiai bélyegeknél megfelelően az ECM molekulák eloszlása is homogénnek bizonyul. (De Zeeuw és mtsai., 1998; Gwyn és mtsai., 1977).

**b.** Hasonlóképpen, a PHN esetében is kíváncsiak voltunk arra, hogy van-e összefüggés a mag területén található neuronok morfológiai és funkcionális tulajdonságai, valamint az ECM molekulák eloszlása között.

**2.** Ezt követően kísérleteinket a BO területére terjesztettük ki, amelyről ismeretes, hogy synapticus hálózatának folyamatos átszerveződése teljes élethosszig megmarad.

Az általunk vizsgált, fokozott synapticus plaszticitással rendelkező területeken expresszált ECM molekulák kimutatása és ezen molekulák expressziós mintázatában megfigyelhető regionális különbségek feltárása, majd az eredmények összevetése a központi idegrendszer egyéb, kevésbé plasztikus területeinek vizsgálata során kapott eredményekkel, segítséget nyújthat az ECM synapticus plaszticitásban betöltött szerepének megismerésében.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. Mintaelőkészítés

A kísérletek kivitelezése a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottságának irányelvei alapján (OI, PHN engedély száma: 11/2011/DEMAB, BO engedély száma: 6/2017/DEMAB) és az EU szabályzatának (European Communities Council Directive of 24 November 1986; 86/609/EEC) megfelelően történt. Vizsgálatainkat 12-14 hetes, felnőtt, nőstény Wistar patkányon (Charles River Laboratory, Strain Crl: WI) végeztük el.

Az állatok altatása 10%-os uretánnal (1.3 ml/100 g testtömeg; Reanal, Budapest, Hungary), intraperitonealis úton történt, amelyet fiziológiás sóoldattal (0.9%) való transcardialis perfúzió követett. Az agytörzsek eltávolítása után a mintákat 1 napra (4°C) Sainte-Marie fixálószerbe (99% abszolút alkohol és 1% jégecet) helyeztük, majd paraffinba történő ágyazást követően, mikrotóm (Leica SM2000R) segítségével, 8 µm vastagságú szeletekből álló frontalis sorozatmetszeteket készítettünk. A szilanizált tárgylemezre helyezett metszeteket deparaffináltuk, rehidráltuk, majd foszfát pufferben (PBS, pH 7.4) történő mosást követően az endogén peroxidáz aktivitás gátlása 3%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oldattal történt (deszt. vízben oldva, szobahőmérséklet, 10 perc). A BO szerkezetének bemutatására Nissl-festést végeztünk.

A hisztokémiai és immunhisztokémiai reakciókat a nem-specifikus kötőhelyek blokkolása előzte meg.

Az OI és a PHN esetében a mintákat a következő blokkoló szerekkel kezeltük: 1% szarvasmarha szérum albumin (BSA) (*HA; Wisteria floribunda* agglutinin, *WFA*), 1% BSA + 10% normál kecske szérum (NGS) (*aggregán*), 2% BSA (*verzikán; HA; HAPLN1*), 3% normál ló szérum (NHS) (*neurokán*), 1% BSA + 10% NHS (*brevikán*) és 1% BSA + 10% normál nyúl szérum (NRS) (*TN-R*).

A BO vizsgálata során a következő blokkoló szereket alkalmaztuk: 3% BSA (*HA; WFA; verzikán*), 3% BSA + 10% NGS (*aggregán*), 3% BSA + 10% NRS (*egérben termelt monoklonális anti-kondroitin szulfát proteoglikán, CAT-301; neurokán*), 3% BSA + 10% normál szamár szérum (NDS) (*brevikán; TN-R; HAPLN1*).

#### 3.2. Hisztokémiai reakciók

##### 3.2.1. *Oliva inferior, nucleus prepositus hypoglossi*

A HA eloszlásának detektálására biotinilált hialuronsav kötő fehérjét (bHABP; R. Tammi és M. Tammi, Dept. Anat. Univ. of Kuopio, Kuopio, Finnország), míg a PNN általános markereként biotinilált *Wisteria floribunda* agglutininint (bWFA; Sigma-Aldrich, St.

Louis, MO, USA) alkalmaztunk. A lektinek csoportjába tartozó WFA specifikusan kötődik a CSPG-ok és GP-ek N-acetil-galaktózamin alegységéhez (Härtig és mtsai., 1992), így általa információt nyerhetünk ezen molekulák neuronok körüli megjelenéséről. Blokkolást követően a metszeteket egy éjszakán át inkubáltuk 4°C-on bHABP-t vagy bWFA-t tartalmazó oldatban, amelyek hígítása 1% BSA-t tartalmazó PBS-ben történt. A reakció vizualizálása ExtrAvidin Peroxidase (Sigma-Aldrich), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és 3,3-diaminobenzidin-tetrahidroklorid (DAB) kromogén segítségével történt. Dehidrációt követően, a metszeteket DPX fedőanyaggal (Sigma-Aldrich) fedtük le.

**3.2.2. Bulbus olfactorius** A HA eloszlásának detektálására bHABP-t (AMS Biotechnology, Abingdon, UK), míg a WFA reakció kivitelezéséhez bWFA-t (Sigma-Aldrich,) alkalmaztunk. Blokkolást követően a metszeteket egy éjszakán át, 4°C-on inkubáltuk bHABP-t vagy bWFA-t tartalmazó oldatban. A bHABP és a bWFA hígítása 1% BSA-t tartalmazó PBS-ben történt. A reakciók vizualizálásához Streptavidin AlexaFluor 555 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) jelölő anyagot használtunk (1:1000, PBS-ben hígítva, 1 óra). A metszeteket DAPI-val kombinált ProLong® Diamond Antifade Mountant (Life Technologies) fedőanyaggal fedtük le.

### 3.3. Immunhisztokémiai reakciók

#### 3.3.1. Oliva inferior, nucleus prepositus hypoglossi

A CSPG-ok és glikoproteinek kimutatása antitestek segítségével történt. Vizsgálataink során az alábbi primer antitesteket használtuk: nyúlban termelt poliklonális anti-aggrekán (Merck Millipore, Billerica, MA, USA), egérben termelt monoklonális anti-verzikán (12C5; Developmental Studies Hybridoma Bank, DSHB; Iowa City, IA, USA), egérben termelt monoklonális anti-neurokán (1F6; DSHB), egérben termelt monoklonális anti-brevikán (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), kecskében termelt poliklonális anti-TN-R (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) és kecskében termelt poliklonális anti-HAPLN1 (R&D Systems). A hisztokémiai és immunhisztokémiai reakciók során alkalmazott primer reagensek adatait az 1. táblázat foglalja össze. Az aggrekán, a brevikán és a verzikán esetében a jobb antigén feltárás érdekében a metszeteket Tris-Na-acetát pufferben (pH8) oldott kondroitináz ABC (1:100; 0.02 U/ml; Sigma-Aldrich) enzimmel való emésztésnek vetettük alá (1 óra, 37°C). A primer antitesteket az adott reakciónak megfelelő szérumot/szérumokat tartalmazó PBS-ben hígítottuk: 1% BSA + 3% NGS (*aggrekán*), 2% BSA (*verzikán*), 1% NHS (*neurokán*), 1%

BSA + 3% NHS (*brevikán*), 1% BSA + 3% NRS (*TN-R*), 1% BSA (*HAPLN1*). Az inkubáció 1 éjszakán át, 4°C-on történt.

A primer reagenseknek megfelelően az alábbi szekunder antitesteket alkalmaztuk (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA): biotinilált, kecskében termelt anti-nyúl IgG (*aggregán*); biotinilált, lóban termelt anti-egér IgG (*verzikán*, *neurokán* és *brevikán*) és biotinilált, nyúlban termelt anti-kecske IgG (*TN-R* és *HAPLN1*). A szekunder antitestek hígítása (1:200) PBS-ben történt. A vizualizáció és a metszetek fedése során a HA és a WFA reakciók esetében leírtak szerint jártunk el.

### 3.3.2. *Bulbus olfactorius*

A CSPG-ok és glikoproteinek kimutatása során az alábbi primer antitesteket használtuk: nyúlban termelt poliklonális anti-aggregán (Merck Millipore), egérben termelt monoklonális anti-kondroitin szulfát proteoglikán (Clone CAT-301, Sigma-Aldrich), egérben termelt monoklonális anti-*verzikán* (DSHB), egérben termelt monoklonális anti-*neurokán* (1F6; DSHB), bárányban termelt poliklonális anti-*brevikán* (R&D Systems), kecskében termelt poliklonális anti-*TN-R* (R&D Systems), kecskében termelt poliklonális anti-*HAPLN1* (R&D Systems). A hisztokémiai és immunhisztokémiai reakciók során alkalmazott primer reagensek adatait az 1. táblázat foglalja össze. Az *aggregán*, a *CAT-301*, a *verzikán* és a *brevikán* esetében a jobb antigén feltárás érdekében a metszeteket Tris-Na-acetát pufferben (pH8) oldott kondroitináz ABC (0.02 U/ml; Sigma-Aldrich) emésztésnek vetettük alá (1 óra, 37°C). A primer antitesteket az adott reakciónak megfelelő szérumot/szérumokat tartalmazó PBS-ben hígítottuk: 1% BSA + 3% NGS (*aggregán*), 1% BSA (*verzikán*), 1% BSA + 3% NRS (*CAT-301*, *neurokán*), 1% BSA + 3% NDS (*brevikán*, *TN-R*, *HAPLN1*). Az inkubáció egy éjszakán át, 4°C-on történt.

A reakciók vizualizálása AlexaFluor 555 jelölőanyaggal konjugált szekunder antitestek (Life Technologies) segítségével történt: kecskében termelt anti-nyúl IgG (*aggregán*), nyúlban termelt anti-egér IgG (*verzikán*, *neurokán*, *CAT-301*), szamárban termelt anti-bárány IgG (*brevikán*) és szamárban termelt anti-kecske IgG (*TN-R*, *HAPLN1*). Az inkubáció időtartama 1 óra volt, a szekunder antitestek hígítása (1:1000) PBS-ben történt. A metszeteket DAPI-val kombinált ProLong® Diamond Antifade Mountant (Life Technologies) fedőanyaggal fedtük le.

**1. táblázat: Az ECM molekulák detektálására alkalmazott próba, lektin és primer antitestek**

	<b>Gyártó, katalógus szám</b>	<b>Faj, típus</b>	<b>Hígítás</b>
<b>bHABP<sup>a</sup> (OI, PHN)</b>	R. Tammi és M. Tammi; Kuopio, Finnország	szarvasmarha ízületi porcából izolált aggregán HA-kötő régiója; biotinizált	1:50
<b>bHABP<sup>a</sup> (BO)</b>	AMS Biotechnology; AMS. HKD-BC41	E.coliban expresszált rekombináns humán verzikán G1 domén; biotinizált	1:100
<b>bWFA<sup>b</sup></b>	Sigma-Aldrich; L1516	<i>Wisteria floribundából</i> izolált lektin; biotinizált	1:500
<b>Anti-aggregán</b>	Merck Millipore; AB1031	nyúl, poliklonális, IgG	1:500
<b>CAT-301<sup>c</sup> (BO)</b>	Sigma-Aldrich; MAB5284	egér, monoklonális, IgG1	1:100
<b>Anti-verzikán</b>	DSHB; 12C5	egér, monoklonális, IgG1	1:100
<b>Anti-neurokán</b>	DSHB; 1F6	egér, monoklonális, IgG1	1:100
<b>Anti-brevikán (OI, PHN)</b>	R&D Systems; AF4009	bárány, poliklonális, IgG	1:100
<b>Anti-brevikán (BO)</b>	BD Biosciences, 610894	egér, monoklonális, IgG1	1:200
<b>Anti-tenaszcin-R</b>	R&D Systems; AF3865	kecske, poliklonális, IgG	1:300
<b>HAPLN1<sup>d</sup></b>	R&D Systems; AF2608	kecske, poliklonális, IgG	1:300

<sup>a</sup> biotinizált hialuronsav kötő fehérje

<sup>b</sup> biotinizált *Wisteria Floribunda* agglutinin

<sup>c</sup> anti-kondroitin szulfát proteoglikán CAT-301 klón

<sup>d</sup> hialuronsav és proteoglikán kötő fehérje 1

A bHABP, a bWFA, a CAT-301 és az anti-brevikán esetében zárójelben tüntettük fel a vizsgált területeket, amelyen/amelyeken a reagenst alkalmaztuk. A többi reagenst mindhárom vizsgált területen alkalmaztuk.

### 3.3.2.1. Kettős fluoreszcens jelölés

Az ECM molekulák pontos lokalizációjának meghatározásához a fent leírt reakciókat a dendritek és az axonok jelölésével kombináltuk. Az axonok feltüntetésére neurofilament elleni antitestet (egérben termelt, monoklonális anti-neurofilament vagy nyúlban termelt, poliklonális anti-neurofilament; Sigma-Aldrich) alkalmaztunk, míg a dendritek jelölése mikrotubulushoz asszociált protein 2 (MAP2) elleni antitest (nyúlban termelt, poliklonális

anti-MAP2; Merck Millipore) segítségével történt. A primer antitestek adatait a 2. táblázat foglalja össze. A neurofilament és a MAP2 elleni antitestekkel történő inkubációt megelőzően a metszeteket 30 percen át szobahőmérsékleten blokkoltuk: 3% BSA + 10% NGS (*egérben termelt anti-neurofilament*), 3% BSA + 10% NDS (*nyúlban termelt anti-neurofilament; nyúlban termelt anti-MAP2*). A primer antitesteket az alábbi oldatokban hígítottuk: 1% BSA + 3% NGS (*egérben termelt anti-neurofilament*) és 1% BSA + 3% NDS (*nyúlban termelt anti-neurofilament; nyúlban termelt anti-MAP2*). Az inkubáció időtartama 1 éjszaka volt (4°C). A szérumok hígítása PBS-ben történt.

Vizsgálataink során a következő antitest kombinációkat alkalmaztuk: egérben termelt monoklonális anti-neurofilament + WFA, egérben termelt monoklonális anti-neurofilament + aggregán, nyúlban termelt poliklonális anti-MAP2 + CAT-301, nyúlba termelt poliklonális anti-neurofilament + verzikán, egérben termelt monoklonális anti-neurofilament + brevikán, nyúlban termelt poliklonális anti-MAP2 + brevikán, egérben termelt monoklonális anti-neurofilament + HAPLN1, nyúlban termelt poliklonális anti-MAP2 + HAPLN1.

A neurofilament és MAP2 reakciók vizualizálása AlexaFluor 488 jelölő anyaggal konjugált szekunder antitestek (Life Technologies) segítségével történt: kecskében termelt anti-egér IgG (*egérben termelt anti-neurofilament*), szamárban termelt anti-nyúl IgG (*nyúlban termelt anti-neurofilament és nyúlban termelt anti-MAP2*). A metszeteket DAPI-val kombinált ProLong® Diamond Antifade Mountant (Life Technologies) fedőanyaggal fedtük le.

**2. táblázat: Az ECM molekulák markereivel kombinált primer antitestek**

	Gyártó, katalógus szám	Faj, típus	Hígítás
<b>Anti-neurofilament</b>	Sigma-Aldrich; N4142	nyúl, poliklonális, IgG	1:80
<b>Anti-neurofilament</b>	Sigma-Aldrich; N5389	egér, monoklonális, IgG1	1:40
<b>Anti-MAP2<sup>a</sup></b>	Merck Millipore; AB5622	nyúl, poliklonális, IgG	1:500

<sup>a</sup> mikrotubulus asszociált protein 2

### **3.4. Az eredmények feldolgozása**

#### **3.4.1. Oliva inferior, nucleus prepositus hypoglossi**

Az OI és a PHN pozíciójának, határainak és rostrocaudalis kiterjedésének meghatározása patkány sztereotaxiás atlasz (Paxinos és Watson, 1998) alapján történt. Az OI almagjainak tanulmányozásához és helyzetük meghatározásához a Gwyn és mtsai. (1977) által leírtakat vettük alapul.

A képeket Nikon Eclipse E800 fénymikroszkóp segítségével készítettük, a kontraszt és a háttér beállításaink minimális módosítását a Photoshop CS4 v11.0 használatával végeztük.

#### **3.4.2. Bulbus olfactorius**

A bulbus olfactorius rétegeinek meghatározása és tanulmányozása patkány sztereotaxiás atlasz (Paxinos és Watson, 1998), valamint Nagayama és mtsai. (2014) által leírtak alapján történt.

A képeket (a szuper-rezolúciós felvételek kivételével) Olympus CX31 epifluoreszcens fénymikroszkóp és DP27 kamera segítségével készítettük, a kontraszt és a háttér beállításaink minimális módosítását a Photoshop CS4 v11.0 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) használatával végeztük. A szuper-rezolúciós felvételeket Olympus FV-3000 konfokális mikroszkóp alkalmazásával készítettük.

#### **3.4.3. A hisztokémiai és immunhisztokémiai reakciók szemikvantitatív kiértékelése**

A hisztokémiai és immunhisztokémiai reakciók szemikvantitatív kiértékelését elvégeztük az OI, a PHN és a BO esetében. Három különböző állat agytörzsének azonos szintjeiből készült, illetve a BO területéről származó metszetek kerültek kiválogatásra, amelyekről az ECM molekulák kimutatására irányuló reakciók elvégzése után felvételeket készítettünk. A reakciók festődési intenzitásának meghatározásához öt fokozatú skálát használtunk (-: nincs festődés, +: gyenge festődés, ++: mérsékelt festődés, +++: erős festődés, ++++: nagyon erős festődés). A BO esetében az ECM kondenzált formáinak előfordulását rétegenként jelöltük. A kiértékelés két személy független véleménye alapján készült, azonos nagyítás, kontraszt és fényerősség beállítását követően, melyet három másik kollégánk ellenőrzött.

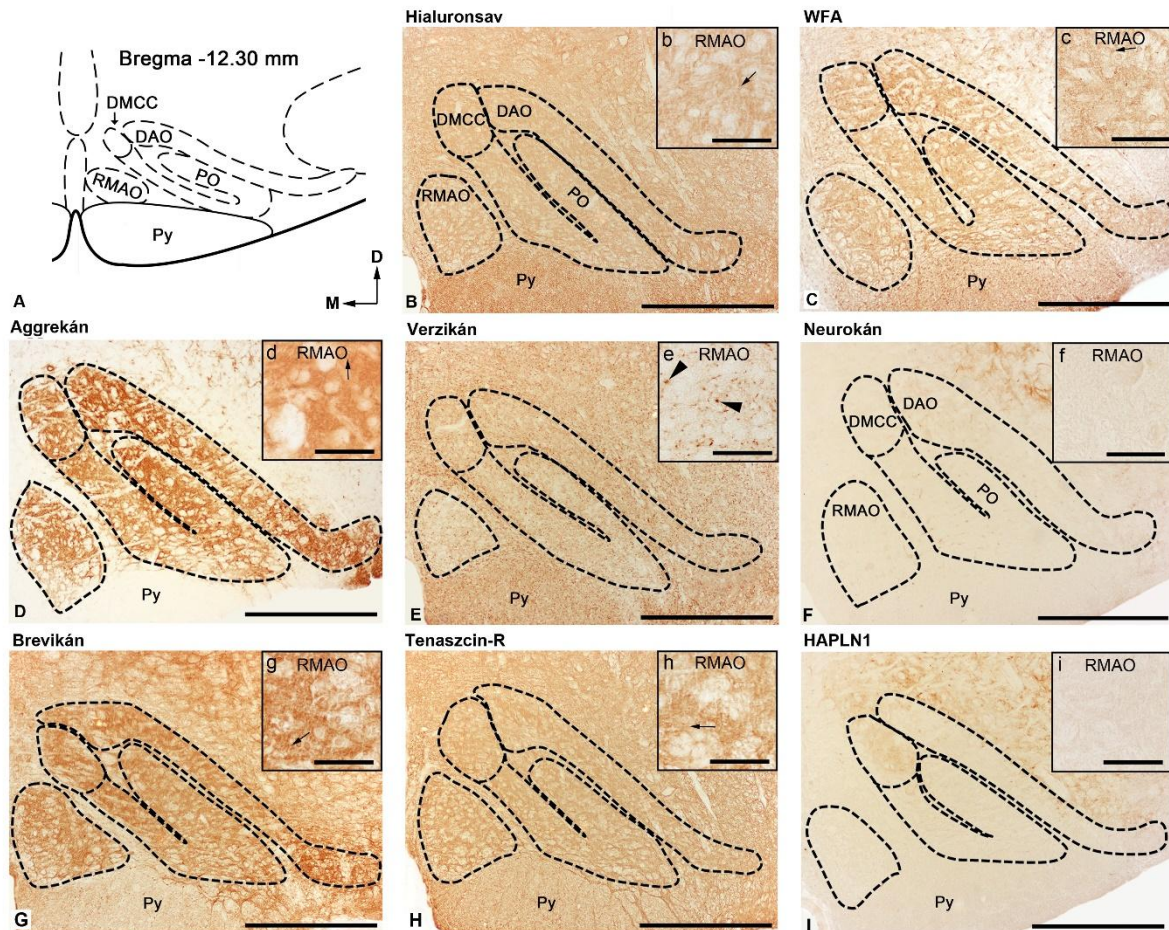
## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. Oliva inferior

Az OI területén az ECM molekulák laza, hálózatos elrendeződését figyeltük meg, a hisztokémiai és immunhisztokémiai reakciók elsősorban a neuropil festődését eredményezték. A sejtek somáját és a dendritek proximalis részét körülvevő kb. 20 µm vastagságú terület nagyon gyengén festődött vagy festetlennek bizonyult, vagyis PNN nem volt megfigyelhető az OI területén (16. és 17. ábra). Ugyanakkor a kondenzált ECM egy másik megjelenési formáját, az AC-ot reprezentáló, 2-4 µm átmérőjű, sötéten festődő, gyűrűszerű struktúrákat figyeltünk meg a neuropilben (Brückner és mtsai., 2008). Az AC-ok megjelenését az OI almagjaiban a 4. táblázat mutatja. A verzikán reakciót követően apró, erősen festődő, pontszerűen jelölődő struktúrák voltak láthatók, melyek a Ranvier-féle befűződések körüli nodalis ECM jelenlétére utalnak (16. E, 17. E ábra).

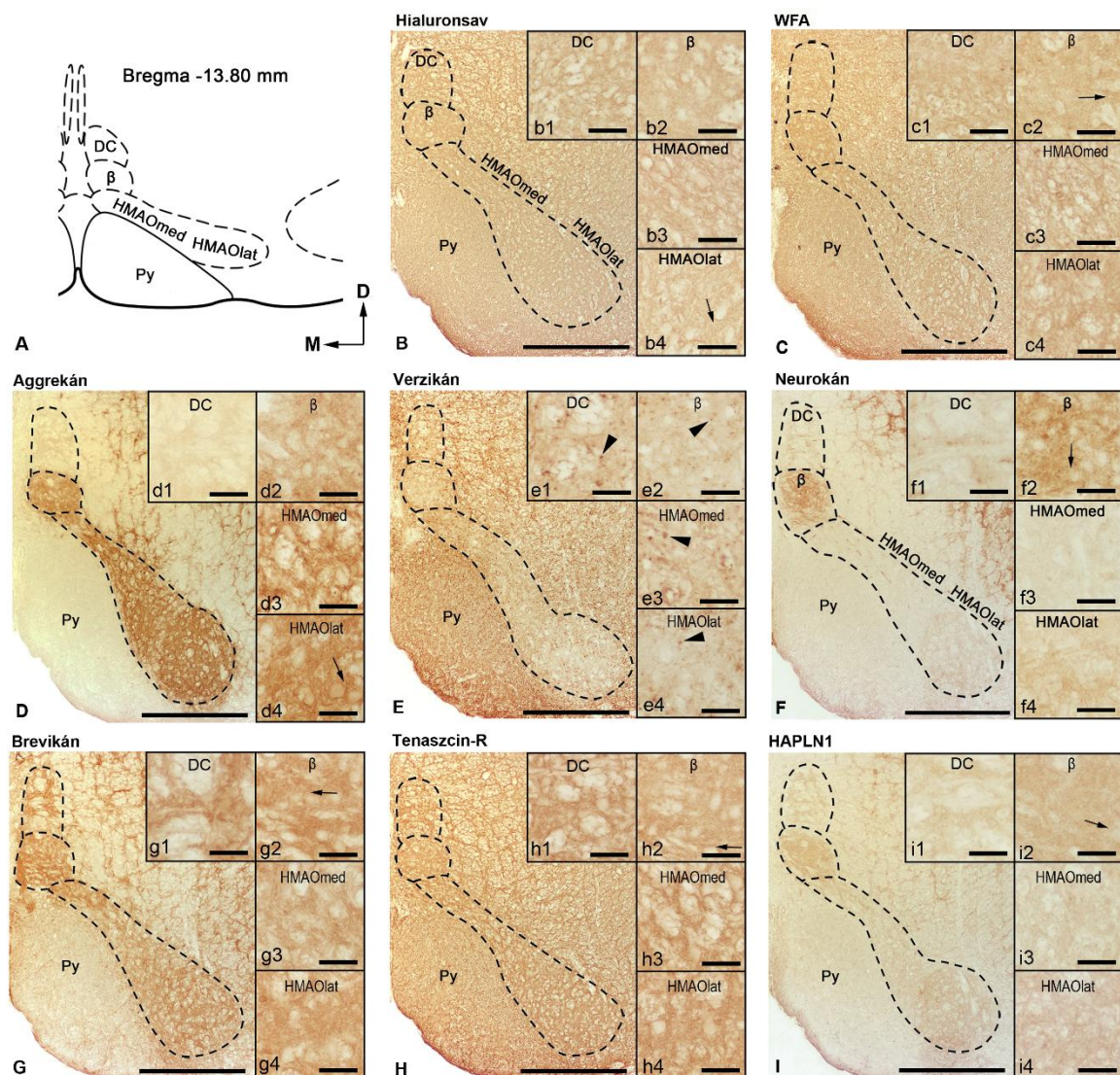
Az **OI rostralis kétharmadában** a PO dorsalis és ventralis lamelláit, a MAO rostralis lamelláját, a DAO és a DMCC almagokat különíthetjük el (16. A ábra) (Azizi és Woodward, 1987; Gwyn és mtsai., 1977). Az ECM reakciók intenzitása különböző az egyes almagok területén, illetve az almagokon belül is eltérések tapasztalhatók. A neuropil festődési intenzitásának szemikvantitatív értékelését az OI rostralis részének almagjaiban az 3. táblázat mutatja. Az *aggrekán* esetében kiemelkedően erős festődés volt megfigyelhető a MAO rostralis lamellájának dorsalis részében, a PO lamelláinak medialis kétharmadában és a DAO dorsomedialis és ventrolateralis részeiben (16. D ábra). A *brevikán* reakció intenzitása szintén kiemelkedően erősnek bizonyult minden almag területén, regionális különbség kizárólag a DAO-ban volt megfigyelhető, ahol a lateralis rész a medialishez viszonyítva intenzívebb festődést mutatott (16. G ábra). A WFA reakció intenzitása ugyan elmaradt az aggrekán és a brevikán esetében tapasztaltakhoz képest, az OI rostralis részének teljes területén erősnek bizonyult, az almagok közül kiemelhetjük a DAO-t, elsősorban annak dorsomedialis részét, ahol a többi almaghoz képest intenzívebb jelet kaptunk (16. C ábra). A HA és a TN-R reakciók esetében mérsékelt festődés volt látható, lényeges intenzitásbeli különbséget sem az almagok között, sem az almagokon belül nem figyeltünk meg (16. B, H ábra). A *verzikán* expressziója a DAO-ban és a DMCC-ben volt a legerősebb, melyeket a PO dorsomedialis, majd ventrolateralis része követett, ahol az előzőekben említett almagokhoz képest gyengébb jelet kaptunk. A leggyengébb jelintenzitás a MAO rostralis lamellájában volt megfigyelhető. A verzikán reakció megjelenése pontszerű mintázatot mutatott (16. E ábra). Gyenge *HAPLN1*

pozitivitás látható a DMCC almagban, míg az OI rostralis részének egyéb területein nem detektáltunk jelet (16. I ábra). A *neurokán* reakció kizárólag a DAO dorsomedialis részében mutatott igen gyenge pozitívítást, míg az OI rostralis részének más régióiban a reakció teljesen negatívnak bizonyult (16. F ábra).



**16. ábra:** Az ECM molekulák eloszlása az oliva inferior rostralis részében. (A) Az agytörzs frontális metszetének sematikus ábrázolása (részlet, Paxinos és Watson, 1998 után módosítva), mely az OI rostralis részének szerkezetét mutatja. Bregmától való távolság -12,30 mm. *DAO*: dorsal accessory olive; *DMCC*: dorsomedial cell column; *PO*: principal olive; *RMAO*: rostral lamella of medial accessory olive; *Py*: pyramis; *M*: medialis; *D*: dorsalis. A *HA* (B) eloszlásának detektálására biotinilált hialuronsav kötő fehérjét, míg a kondroitin szulfát proteoglikánok általános markereként biotinilált *Wisteria floribunda* agglutinint (*WFA*) (C) alkalmaztunk. Az *aggrekán* (D), *verzikán* (E), *neurokán* (F), *brevikán* (G), *TN-R* (H) és *HAPLN1* (I) kimutatása antitestek segítségével történt. A betétképeken a MAO rostralis lamellája látható, melyeken a *nyilak* (b, c, d, g, h) AC-nak megfelelő struktúrákat jelölnek, míg a *nyílhegyek* (e) a *verzikán* reakció pontszerű megjelenését mutatják a neuropilben. Lépték: 500  $\mu$ m (B, C, D, E, F, G, H, I); 50  $\mu$ m (b, c, d, e, f, g, h, i).

Az OI területén caudalis irányba haladva a MAO rostralis lamellája, a PO, a DAO és a DMCC almagok fokozatosan eltűnnek, az OI caudalis egyharmadát a MAO horizontális lamellája, a VLO-val asszociált DC és a nucleus  $\beta$  almagok alkotják (17. A ábra) (Azizi és Woodward, 1987; Gwyn és mtsai., 1977). Az **OI caudalis egyharmadában** az ECM festődésének intenzitása az egyes almagok között jóval szembetűnőbb különbségeket mutatott a rostralis egyharmadban tapasztaltakhoz képest, illetve a festetlen területek mérete és előfordulási gyakorisága szintén növekedett (17. ábra, 3. táblázat).



**17. ábra:** Az ECM molekulák eloszlása az oliva inferior caudalis részében. (A) Az agytörzs frontális metszetének sematikus ábrázolása (részlet, Paxinos és Watson, 1998 után módosítva), mely az OI caudalis részének szerkezetét mutatja. Bregmától való távolság -13,80 mm. DC: dorsal cap;  $\beta$ : nucleus  $\beta$ ; HMAO lat: lateral part of horizontal lamella of medial accessory olive; HMAO med: medial part of horizontal lamella of medial accessory olive; Py: pyramis; M: medialis; D: dorsalis. A HA (B) eloszlásának detektálására biotinilált hialuronsav kötő fehérjét, míg a kondroitin szulfát proteoglikánok általános markereként biotinilált *Wisteria*

*floribunda* agglutinint (WFA) (C) alkalmaztunk. Az *aggrekán* (D), *verzikán* (E), *neurokán* (F), *brevikán* (G), *TN-R* (H) és *HAPLN1* (I) kimutatása antitestek segítségével történt. A betétképeken az OI almagjai láthatók, melyeken a *nyilak* (b4, c2, d4, f2, g2, h2, i2) AC-nak megfelelő struktúrákat jelölnek, míg a *nyilhegyek* (e1-4) a *verzikán* reakció pontszerű megjelenését mutatják a neuropilben. Lépték: 500 µm (B, C, D, E, F, G, H, I); 50 µm (b1-4, c1-4, d1-4, e1-4, f1-4, g1-4, h1-4, i1-4).

Az *aggrekán* reakció a MAO horizontális lamellájának területén kiemelkedően erősnek bizonyult, ezt követi a nucleus  $\beta$ , míg a DC-ben csak nagyon alacsony jelintenzitást detektáltunk (17. D ábra). A *brevikán* reakció a nucleus  $\beta$  és a DC területén erős festődést mutatott, míg a MAO horizontális lamellájában az előző almagokhoz képest gyengébb jel volt megfigyelhető (17. G ábra). A HA, a WFA és a TN-R reakciók erős festődést mutattak, viszont regionális különbségek nem fedezhetők fel az egyes almagok között (17. B, C, H ábra). A *verzikán* festődése a DC-ben és a MAO horizontális lamellájának medialis részében erősnek bizonyult, míg a nucleus  $\beta$  és a MAO horizontális lamellájának lateralis részében gyengébb jelet figyeltünk meg. A reakció, hasonlóan az OI rostralis részében tapasztaltakhoz, pontszerű megjelenést mutatott (17. E ábra). A *neurokán* festődési intenzitása a nucleus  $\beta$ -ban erős volt, ezzel szemben a DC és a MAO horizontális lamellájának lateralis részében gyenge jelet detektáltunk, a MAO horizontális lamellájának medialis része pedig festetlennek bizonyult (17. F ábra). A *HAPLN1* expressziós mintázata a *neurokánéhoz* hasonlóan mutatkozott, a reakció erőssége azonban általánosan gyengébbnek bizonyult (17. I ábra).

**3. táblázat: A neuropil festődési intenzitásának szemikvantitatív értékelése az oliva inferior almagjaiban**

	rostralis OI				caudalis OI			
	RMAO	DAO	DMCC	PO	DC (VLO)	$\beta$	HMAO med	HMAO lat
<b>Hialuronsav</b>	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
<b>WFA</b>	+++	++++*	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<b>Aggrekán</b>	++++*	++++*	++++	++++*	-	+++	++++	++++
<b>Verzikán</b>	#	##	##	-/#*	##	#	##	#
<b>Neurokán</b>	-	-/+*	-	-	+	+++	-	+
<b>Brevikán</b>	++++	++++*	++++	++++	+++	++++	+++	+++
<b>Tenasczin-R</b>	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
<b>HAPLN1</b>	-	-	+	-	+	++	+	++

A festődési intenzitás kiértékeléséhez használt fokozatok:

-: nincs festődés

+: gyenge festődés

++: mérsékelt festődés

+++ : erős festődés

++++: nagyon erős festődés

\*: az ECM molekulák festődési intenzitása és eloszlása különbséget mutat az almagon belül

#: erősen festődő pontszerű struktúrák jelenléte a kevésbé intenzíven jelölődött neuropilben

Az OI teljes rostrocaudalis kiterjedésében megfigyelhető az AC-ok jelenléte, bár előfordulásuk jelentős különbségeket mutat az egyes ECM molekulák esetében a különböző almagok területén. A rostralis rész almagjaiban a HA, a WFA, az aggregán, a verzikán, a brevikán és a TN-R reakciók igazolták az AC-ok jelenlétét, míg a neurokán és a HAPLN1 esetében ilyen struktúrákat nem tudtunk azonosítani. Az AC-ok a caudalis rész minden almagjában megfigyelhetők voltak a HA, a WFA és a TN-R reakciók esetében, míg a verzikán reakciót követően nem láttunk AC-nak megfelelő struktúrákat. Az aggregán, a neurokán, a brevikán és a HAPLN1 reakciók esetében az OI caudalis részében az AC-ok megjelenése magonként változó volt. Az AC-ok megjelenését az OI egyes almagjaiban a 4. táblázat mutatja.

**4. táblázat: Az axonal coat-ok megjelenése az oliva inferior almagjaiban**

	rostralis OI				caudalis OI			
	RMAO	DAO	DMCC	PO	DC (VLO)	$\beta$	HMAO med	HMAO lat
<b>Hialuronsav</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>WFA</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Aggregán</b>	+	+	+	+	-	+	+	+
<b>Verzikán</b>	+	+	+	+	-	-	-	-
<b>Neurokán</b>	-	-	-	-	-	+	-	+
<b>Brevikán</b>	+	+	+	+	-	+	+	+
<b>Tenaszcin-R</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>HAPLN1</b>	-	-	-/+	-	-	+	+	+

-: AC nincs jelen; +: AC jelen van.

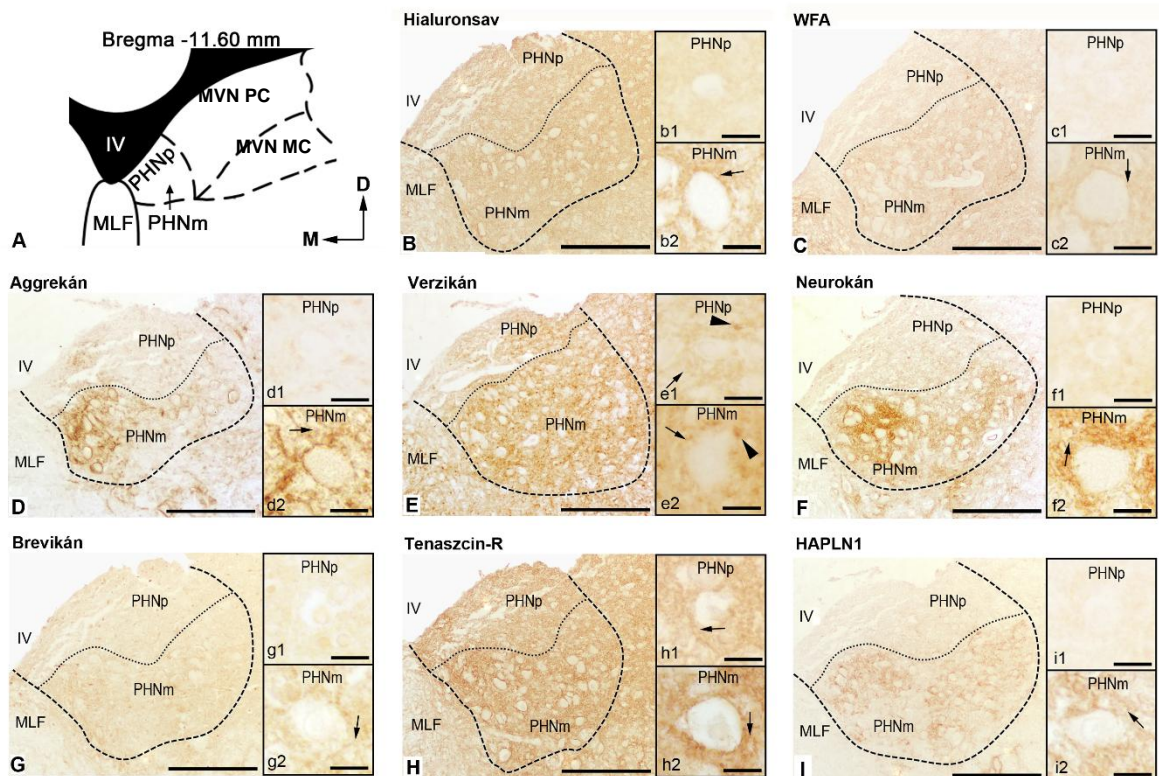
## 4.2. Nucleus prepositus hypoglossi

A PHN parvocellularis és magnocellularis részében az ECM molekulák eltérő eloszlási mintázatot mutatnak (18. ábra). A két terület között különbségek figyelhetők meg a neuropil festődési intenzitásában, valamint a PNN megjelenésében is. A vizsgált molekulák eloszlása az alegységeken belül sem egyenletes.

A PHN magnocellularis részében PNN előfordulását figyeltük meg a HA, a WFA, az aggregán, a TN-R és a HAPLN1 reakciókat követően, bár a pericellularis festődés intenzitása jelentős különbségeket mutatott a magnocellularis terület sejtjei körül. A legintenzívebb festődés az aggregán és a TN-R esetében volt látható, míg a HA, a HAPLN1 és a WFA reakciót követően az előzőekhez képest gyengébb jelet kaptunk a brevikán és a neurokán jelölését követően PNN jelenlétét nem tudtuk igazolni. A verzikán reakciót követően sötétén festődő pontszerű jel volt megfigyelhető a pericellularis régióban. A PHN parvocellularis részében az ECM molekulák ritkán alakítanak ki PNN-t, kizárólag az aggregán és a TN-R molekulák esetében figyeltünk meg halvány pericellularis jelölődést a sejtek körül (18. ábra). A PHN parvocellularis és magnocellularis részében előforduló PNN-ek festődési intenzitásának szemikvantitatív értékelését a 5. táblázat mutatja.

A neuropil festődését minden egyes vizsgált ECM molekula esetében megfigyeltük a PHN teljes területén, azonban a legtöbb esetben a magnocellularis részben erősebb jel volt detektálható (18. ábra; 5. táblázat). A parvocellularis és a magnocellularis alegység közötti legszembetűnőbb különbség a neurokán és az aggregán reakciók esetében volt megfigyelhető, míg a HA, a WFA, a verzikán és a HAPLN1 jelölését követően kisebb intenzitásbeli eltérést találtunk a mag két alegysége között (5. táblázat). A TN-R és a brevikán esetében a reakcióintenzitás hasonló volt a parvocellularis és a magnocellularis területeken. A neuropil festődési intenzitása az almagokon belül sem volt egységes, elsősorban a magnocellularis területen találtunk regionális különbségeket. A magnocellularis rész medialis egyharmadában az aggregán és a neurokán fokozott expresszióját figyeltük meg (18. D, F ábra), míg a laterális kétharmadban a WFA, az aggregán, a neurokán és a HAPLN1 egyenetlen eloszlása, illetve változatos festődési intenzitása látható (18. C, D, F, I ábra). A PHN parvocellularis területén néhány, sötétén festődő, szabálytalan terület volt megfigyelhető az aggregán, a verzikán és a TN-R esetében (18. D, E, H ábra). Az ECM reakciókat követően a neuropilben, elsősorban a magnocellularis területen, ovális vagy kerek, 2-4  $\mu\text{m}$  átmérőjű, intenzíven festődő struktúrák rajzolódtak ki, melyek megfelelnek a Brückner és mtsai. (2008) által leírt AC-nak (18. B-I ábra; 6. táblázat). A verzikán reakció eredményeként nagyszámú, erősen festődő pontszerű

képletet figyeltünk meg a neuropil területén, melyek a nodalis ECM jelenlétére utalnak (18. E ábra).



**18. ábra:** Az ECM molekulák eloszlása a nucleus prepositus hypoglossi (PHN) területén. (A) Az agytörzs frontális metszetének szematikusan ábrázolása (részlet, Paxinos és Watson, 1998 után módosítva), mely az PHN szerkezetét mutatja. Bregmától való távolság -11,60 mm. *MLF*: fasciculus longitudinalis medialis; *PHNp*: nucleus prepositus hypoglossi parvocellularis almag; *PHNm*: nucleus prepositus hypoglossi magnocellularis almag; *IV*: IV. agykamra; *MVN PC*: nucleus vestibularis medialis parvocellularis almag; *MVN MC*: nucleus vestibularis medialis magnocellularis almag. A HA (B) eloszlásának detektálására biotinilált hialuronsav kötő fehérjét, míg a kondroitin szulfát proteoglikánok általános markereként biotinilált *Wisteria floribunda* agglutinint (WFA) (C) alkalmaztunk. Az aggregán (D), verzikán (E), neurokán (F), brevikán (G), TN-R (H) és HAPLN1 (I) kimutatása antitestek segítségével történt. A betétképeken a PHN parvocellularis és magnocellularis almagjai láthatók, melyeken a nyilak AC-nak megfelelő struktúrákat jelölnek (b2, c2, d2, e1-2, f2, g2, h1-2, i2), míg a nyílhegyek (e1-2) a verzikán reakció pontszerű megjelenését mutatják a neuropilben. Lépték: 200  $\mu$ m (B, C, D, E, F, G, H, I); 20  $\mu$ m (b1-2, c1-2, d1-2, e1-2, f1-2, g1-2, h1-2, i1-2).

**5. táblázat: A perineuronális háló (PNN) és a neuropil festődési intenzitásának szemikvantitatív kiértékelése a nucleus prepositus hypoglossi (PHN) parvocellularis és magnocellularis részében**

	PNN		Neuropil	
	PHN magnocellularis almag	PHN parvocellularis almag	PHN magnocellularis almag	PHN parvocellularis almag
<b>Hialuronsav</b>	++	-	+++	++
<b>WFA</b>	+	-	++	+
<b>Aggrecán</b>	+++	+	+++*	+#
<b>Verzikán</b>	-	-	###	##*
<b>Neurokán</b>	-	-	++++*	+
<b>Brevikán</b>	-	-	+	+
<b>Tenaszcín-R</b>	+++	+	+++*	+++*
<b>HAPLN1</b>	+	-	++*	+

A PNN és a neuropil festődési intenzitásának kiértékeléséhez használt fokozatok:

-: nincs festődés

+: gyenge festődés

++: mérsékelt festődés

+++ : erős festődés

++++: nagyon erős festődés

#: erősen festődő pontok jelenléte a neuropilben

\*: a reakció regionális intenzitásbeli különbséget mutatott az adott almagon belül

**6. táblázat: Az axonal coat-ok (AC) jelenléte a nucleus prepositus hypoglossi (PHN) parvocellularis és magnocellularis részében**

	PHN	
	magnocellularis almag	parvocellularis almag
<b>Hialuronsav</b>	+	-
<b>WFA</b>	+	-
<b>Aggrecán</b>	+	-/+
<b>Verzikán</b>	+	+
<b>Neurokán</b>	+	-/+
<b>Brevikán</b>	+	-
<b>Tenaszcín-R</b>	+	+
<b>HAPLN1</b>	+	-/+

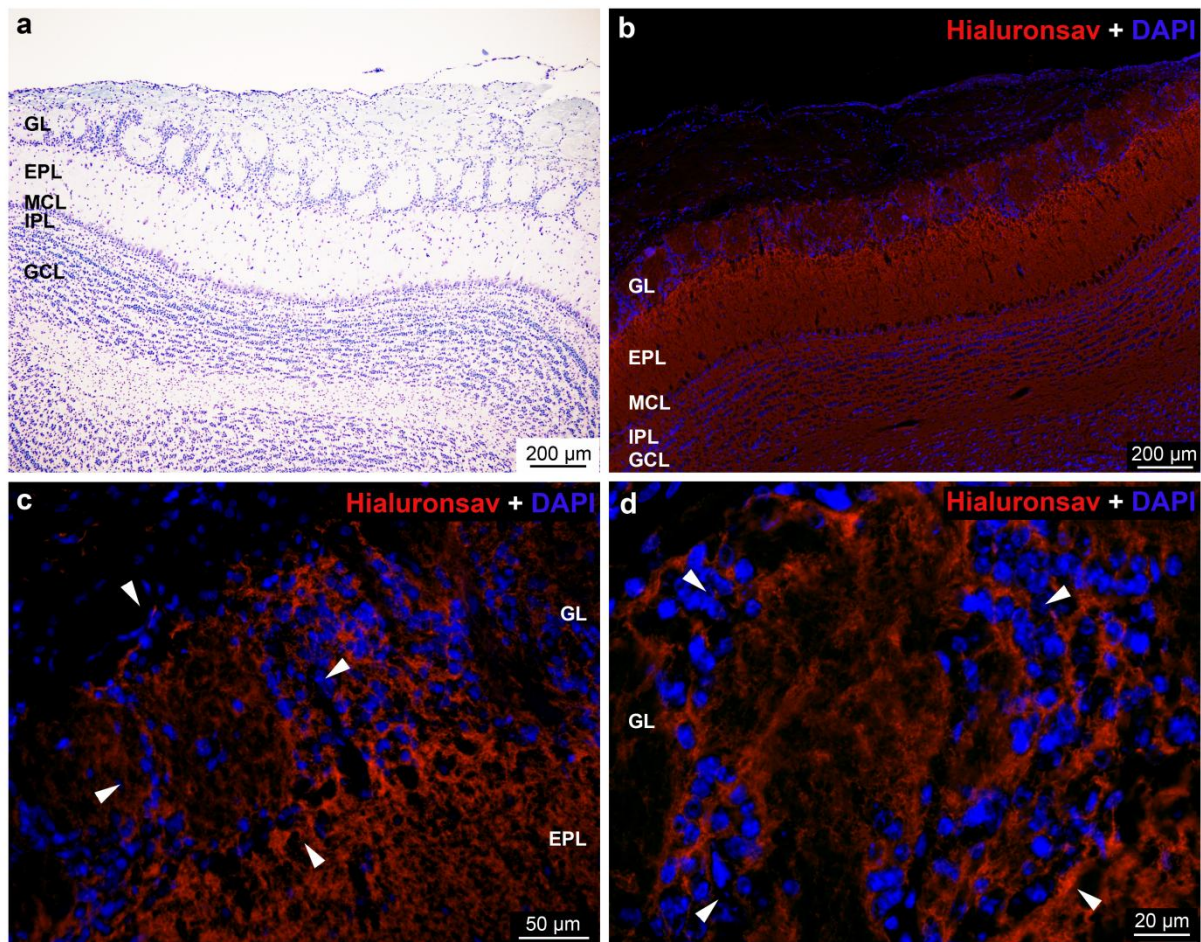
-: AC nincs jelen; +: AC jelen van.

### **4.3. Bulbus olfactorius**

A BO különböző rétegeiben az elvégzett hisztokémiai és immunhisztokémiai reakciók intenzitása, illetve a rétegeken belül a vizsgált molekulák eloszlási mintázata eltérőnek bizonyult. Az ECM elsősorban diffúz formában jelent meg a neuropil területén. Ebben a laza szerkezetben, bizonyos reakciók esetében számos, kisméretű, gyűrűszerű, az AC-ot reprezentáló struktúra, valamint a nodalis ECM jelenlétére utaló, erősen festődő, pontszerűen jelölődés volt megfigyelhető (Bekku és mtsai., 2009; Bekku és Ohashi, 2010; Brückner és mtsai., 2008). Az ECM kondenzált formájának harmadik típusa, a PNN, mely körülöleli a neuronok sejttestét és dendritjeinek proximalis részét, ritkán fordult elő a BO területén. Ezen kevés számú esetben a PNN három megjelenési formája közül (vékony, robosztus, diffúz) (Jäger és mtsai., 2013; Wegner és mtsai., 2003) kizárólag a vékony típusút figyeltük meg. Az ECM molekulák rétegenkénti eloszlásának szemikvantitatív kiértékelését a 7. táblázat foglalja össze.

#### **4.3.1. Hialuronsav**

A HA a BO minden rétegében megtalálható volt, bár megjelenése elsősorban a neuropil területére korlátozódott (19. b ábra). A glomerulusokat határoló periglomerularis sejtek körül fokozott reakcióintenzitás volt megfigyelhető, azonban a sejtek nagy száma és szoros elhelyezkedése miatt a PNN előfordulása egyértelműen nem igazolható (19. c, d ábra). A glomerulusokon belül foltszerűen előforduló HA pozitív és negatív területeket azonosítottunk (19. c, d ábra). A BO egyéb rétegeiben a HA reakció mérsékelt intenzitást mutatott, kivételt képezett az EPL, melynek területén egy felszínesen elhelyezkedő, intenzíven festődő sáv jelent meg (19. b, c ábra). Az MCL néhány sejtje körül gyengén festődő PNN-t figyeltünk meg.

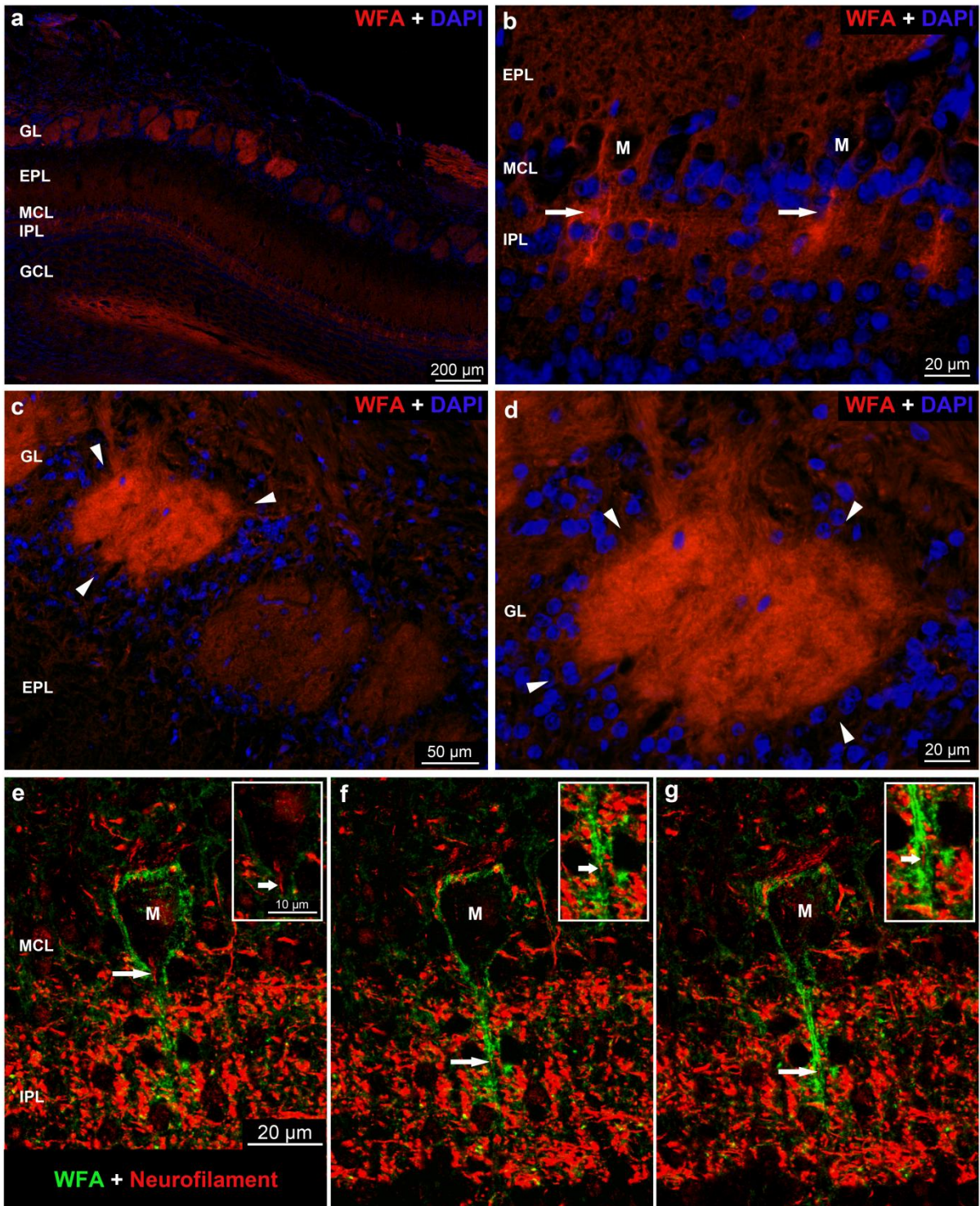


**19. ábra:** A HA eloszlása patkány BO területén. (a) A BO frontális metszete, Nissl festés; *GL*: glomerularis réteg, *EPL*: külső plexiform réteg, *MCL*: mitralis sejtek rétege, *IPL*: belső plexiform réteg, *GCL*: granularis sejtek rétege. A b-d ábrán szereplő rövidítések jelentése megegyezik az előbbieken felsoroltakkal. (b-d) A HA eloszlásának detektálására biotinilált hialuronsav kötő fehérjét alkalmaztunk, melyet *DAPI* magfestéssel kombináltunk. (c-d) A *nyílhegyek* a periglomerularis térséget jelölik.

#### 4.3.2. Kondroitin szulfát proteoglikánok általános kimutatása – WFA

A WFA reakció a BO teljes területén pozitívást mutatott, bár a festődés mintázata és intenzitása eltérő volt az egyes rétegekben (20. a ábra). A GL-ben a glomerulusok festődési intenzitása jelentős különbségeket mutatott, a nagyon erős reakciótól egészen a nagyon halvány jelintenzitásig találhatunk közöttük reprezentatív példát. A periglomerularis térségben csak nagyon gyenge jel volt detektálható, míg a glomerulusokon belül sötétebb, világosabb és néhol festetlen területek szigetszerű megjelenését figyeltük meg (20. a, c, d ábra). Az EPL felszínes rétege meglehetősen gyenge jelet adott, szinte festetlennek bizonyult a mélyebb területekhez képest (20. a-c ábra). Az IPL területén igen erős reakcióintenzitás volt megfigyelhető, mely jellegzetes festődési mintázattal párosult, hiszen a reakció elvégzését

követően a BO felszínére merőleges lefutású, erősen festődő sávok jelentek meg ebben a rétegben (20. a, b, e, f, g ábra). Anti-neurofilamenttel történő kettős jelölést követően megállapítottuk, hogy a WFA pozitív sávok axonok köré lokalizálódnak, melyek feltételezhetően a mitralis sejtek axonjainak felelnek meg (20. e, f, g ábra). A 20. ábra sorozatfelvételei (e-g) bemutatják, hogy a WFA jelölés követi a mitralis sejt axonjának lefutását, majd elérve a sejttestet, körülötte PNN-t alakít ki. A WFA reakció a GCL egész területén gyengének bizonyult (20. a ábra).

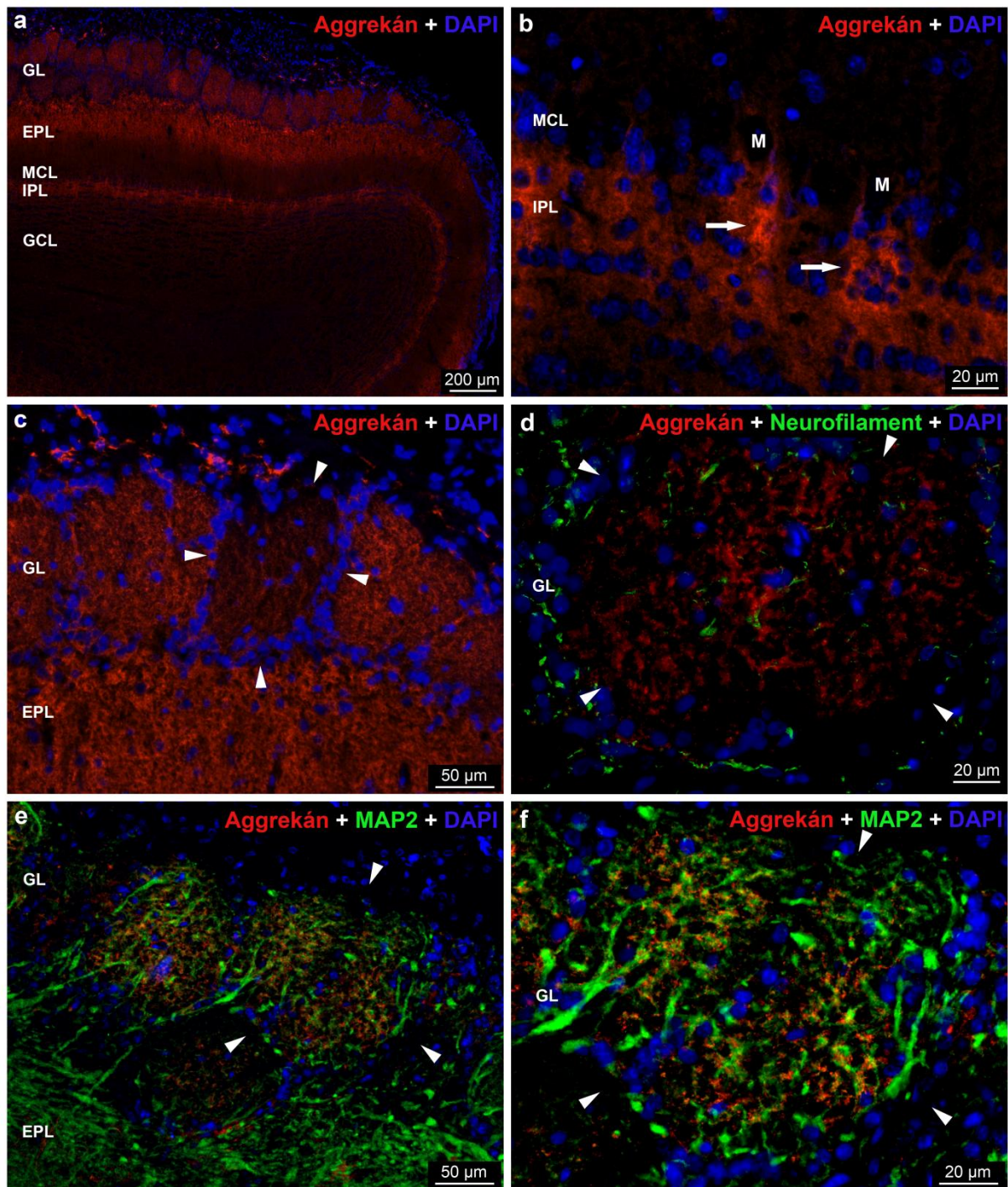


**20. ábra:** A kondroitin szulfát proteoglikánok általános eloszlása patkány BO területén. (a-d) A kondroitin szulfát proteoglikánok általános markereként biotinilált *Wisteria floribunda* agglutinit (WFA) alkalmaztunk, melyet DAPI magfestéssel kombináltunk. (a) Kis nagyítású felvétel, mely a WFA eloszlását mutatja a BO egyes rétegein belül. GL: glomerularis réteg, EPL: külső plexiform réteg, MCL: mitralis sejtek rétege, IPL: belső plexiform réteg, GCL: granularis sejtek rétege. A b-g ábrán szereplő rövidítések jelentése megegyezik az előbbieken felsoroltakkal. (b) A nyilak az IPL-ben erősen festődő WFA pozitív sávokat mutatják. (c-d) A nyílhegyek a periglomerularis térséget jelölik. (e-g) Sorozatfelvétel, mely bemutatja, hogy a WFA jelölés (zöld)

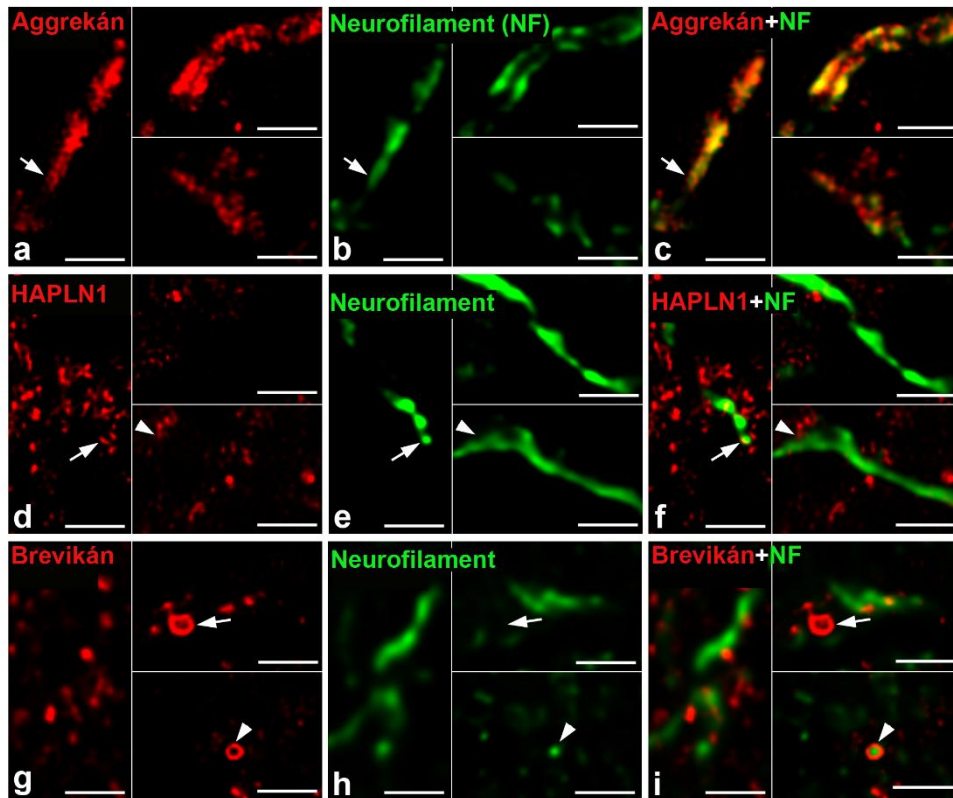
követi az anti-neurofilamenttel jelölt (piros) mitralis sejt (*M*) axonjának lefutását (*nyíl*), majd elérve a sejttestet, körülötte PNN-t alakít ki.

### 4.3.3. Aggrekán

Az előző reakciókhoz hasonlóan, az aggrekán esetében is elsősorban a neuropil területén figyeltük meg az ECM diffúz formájának jelölődését. A GL-ben a WFA reakcióhoz hasonlóan a glomerulusok túlnyomó többsége erősen festődött, nagyobb nagyításon pedig a glomerulusokon belül jól látható volt az erősen festődő és festetlen területek szigetszerű váltakozása, valamint megfigyelhettük az AC-ok jelenlétét is (22. c ábra). A periglomerularis térben csak nagyon gyenge jelet detektáltunk (21. a, c, d ábra). Az aggrekán expresszió pontos lokalizációjának meghatározásához az aggrekán jelölését MAP2, illetve neurofilament elleni antitestekkel kombináltuk. A MAP2 reakció igazolta a dendritek nagyszámú jelenlétét a glomerulusok területén, míg a neurofilament elleni antitesttel jelölődött axonok csekély számban voltak jelen (21. d, e, f ábra). Az EPL felszínes rétegében erős aggrekán jelet figyeltünk meg (21. a, c ábra). Az IPL-ben az aggrekán reakciót követően intenzíven festődő sávok jelentek meg, melyek egy része az MCL-be követhető, ahol a mitralis sejtek somáját körülölelő PNN-ben folytatódnak (21. b ábra). Az aggrekán reakció a GCL-ben nem mutatott pozitívítást (21. a ábra).



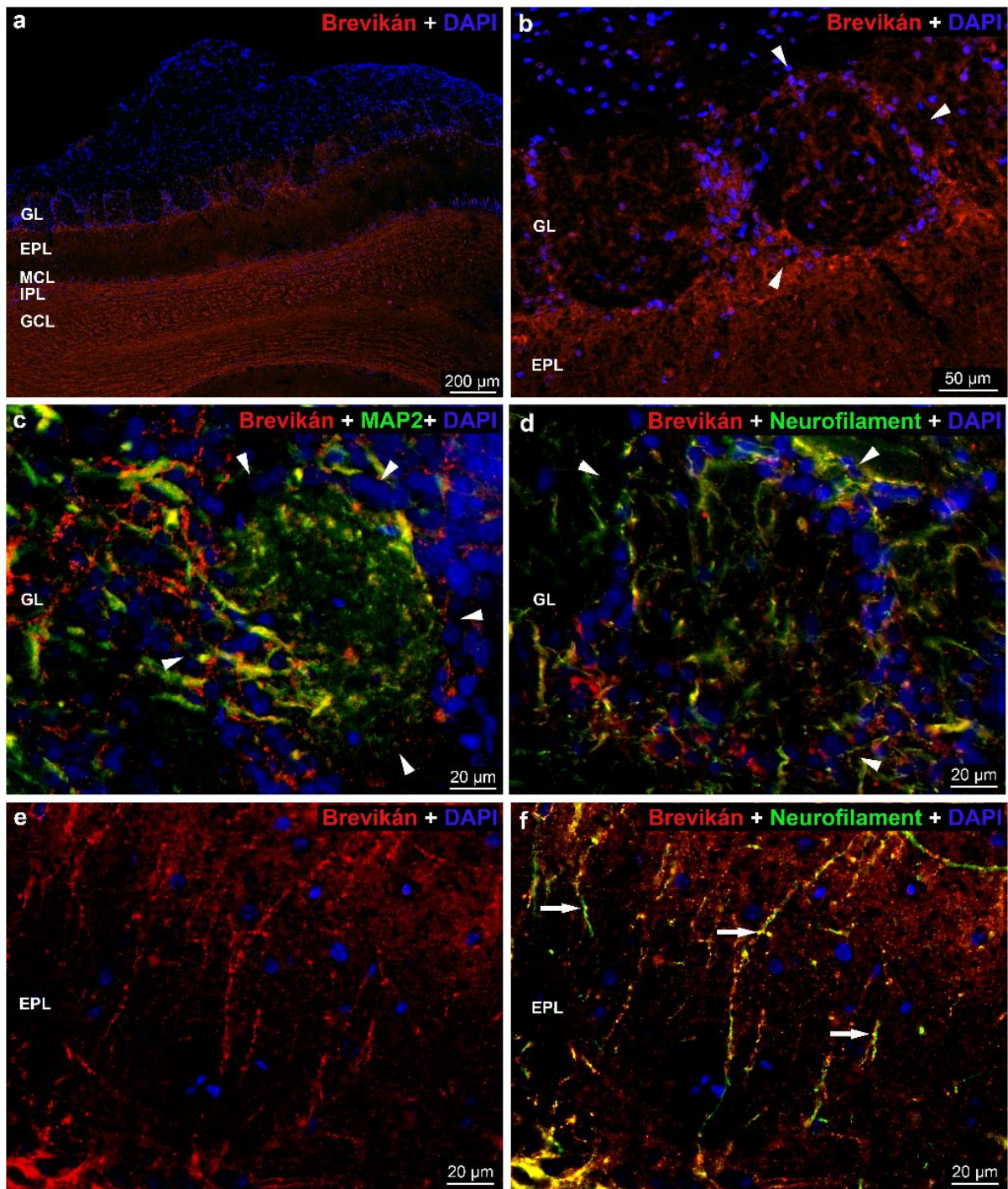
**21. ábra:** Az aggregán eloszlása patkány BO területén. (a-f) Az aggregán kimutatása antitestek segítségével történt, az aggregán reakciót *DAPI* magfestéssel kombináltuk. (a) Kis nagyítású felvétel, mely az aggregán eloszlását mutatja a BO egyes rétegein belül. *GL*: glomerularis réteg, *EPL*: külső plexiform réteg, *MCL*: mitralis sejtek rétege, *IPL*: belső plexiform réteg, *GCL*: granularis sejtek rétege. A b-f ábrán szereplő rövidítések jelentése megegyezik az előbbieken felsoroltakkal. (b) A nyilak az IPL-ben erősen festődő aggregán pozitív sávokat mutatják. *M*: mitralis sejt. (c-f) A nyílhegyek a periglomerularis térséget jelölik. (d) Az aggregán reakciót (piros), neurofilament elleni antitest használatával, az axonok jelölésével (zöld) kombináltuk. (e-f) Az aggregán reakciót (piros), a MAP2 elleni antitest alkalmazásával, a dendritek jelölésével (zöld) kombináltuk.



**22. ábra:** Az extracelluláris makromolekulák akkumulációja a vékony idegrostok körül a BO glomerulusaiban. A super-rezolúciós felvételeken az *aggrekán* (a, c), a *HAPLN1* (d, f) és a *brevikán* (g, i) immunreakció látható a *neurofilament* pozitív idegrostok körül a BO glomerulusaiban (b, c, e, f, h, i). A három molekula közül az *aggrekán* expressziója volt a legerősebb, mely a *neurofilament* pozitív axonok körül hálózatos elrendeződést mutatott (c). A *HAPLN1* reakció egyaránt látható volt a *neurofilament* pozitív idegrostok közötti térben (f, *nyíl*), valamint a jelölt rostok szoros közelségében (f, *nyílhegy*). A *brevikán* megjelenése a *HAPLN1*-hez hasonló mintázatot mutatott azzal a különbséggel, hogy *brevikán* pozitív gyűrűk megfigyelhetők voltak a *neurofilament* pozitív axonok (i, *nyílhegy*), illetve a *neurofilamentre* nézve negatív struktúrák körül is (i, *nyíl*). Lépték: 1  $\mu$ m.

#### 4.3.4. Brevikán

A WFA és az *aggrekán* reakciókkal ellentétben, a *brevikán* esetében csak gyenge jelet detektáltunk a GL-ben. Intraglomerularisan *brevikán* pozitív és negatív területek váltakozása (23. a, b ábra), valamint szórványosan AC-ok jelenléte volt megfigyelhető (22. i ábra). A *brevikán* jelölését az *aggrekán*hoz hasonlóan MAP2, illetve *neurofilament* elleni antitestekkel párosítottuk. Ebben az esetben is szembetűnő volt a MAP2 reakció eredményeként jelölődött dendritek nagy száma, valamint a *neurofilament* elleni antitesttel kimutatott axonok csekély mennyisége a glomerulusok területén (23. c, d ábra). A periglomerularis régióban a *brevikán* expressziója erősnek bizonyult (23. a-d ábra).



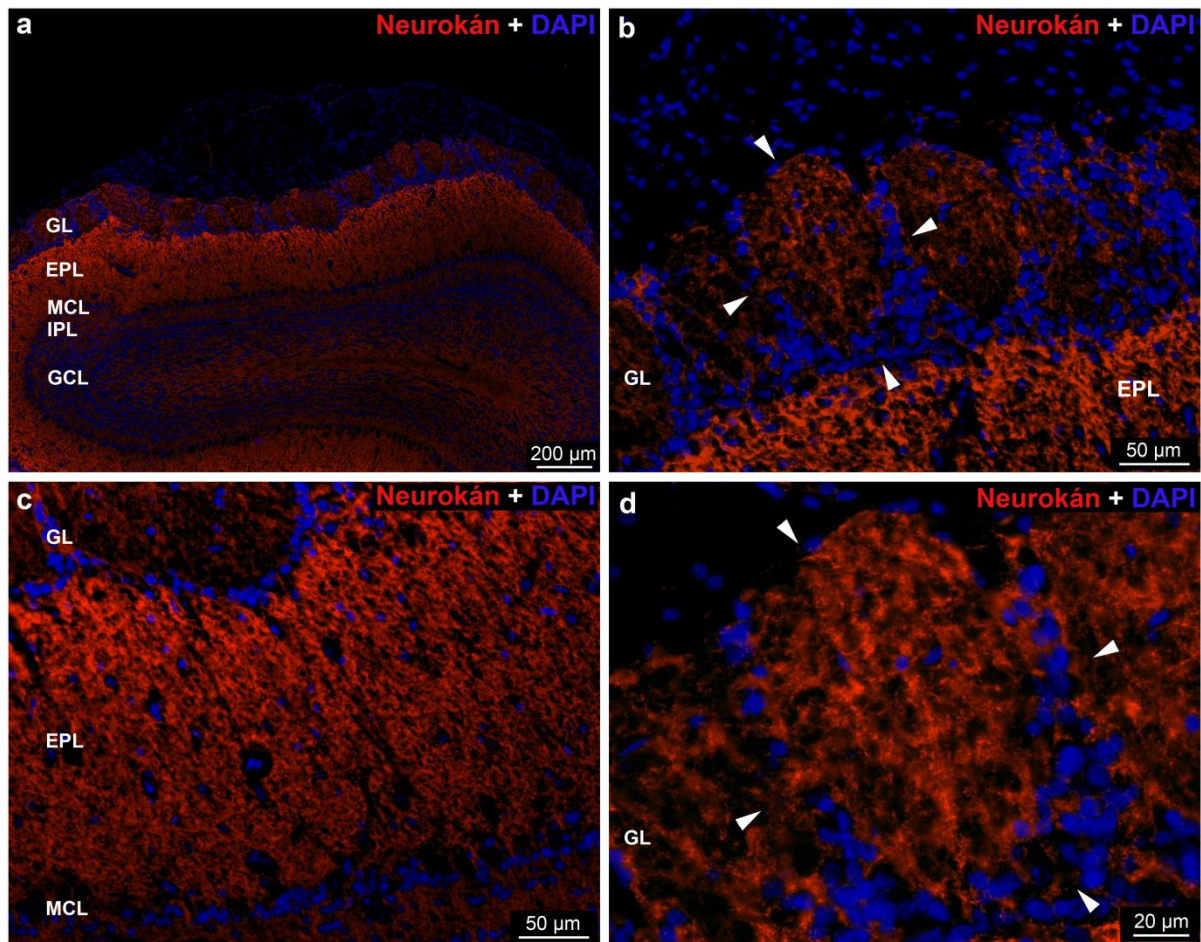
**23. ábra:** A brevikán eloszlása patkány BO területén. (a-f) A brevikán kimutatása antitestek segítségével történt, a brevikán reakciót *DAPI* magfestéssel kombináltuk. (a) Kis nagyítású felvétel, mely a brevikán eloszlását mutatja a BO egyes rétegein belül. *GL*: glomerularis réteg, *EPL*: külső plexiform réteg, *MCL*: mitralis sejtek rétege, *IPL*: belső plexiform réteg, *GCL*: granularis sejtek rétege. A b-f ábrán szereplő rövidítések jelentése megegyezik az előbbieken felsoroltakkal. (b-d) A nyílhegyek a brevikán pozitív periglomerularis régióra mutatnak. (b) Intraglomerularisan brevikán pozitív és negatív területek váltakozása látható. Közvetlenül a *GL* alatt, az *EPL* felszínes rétegében, erősen festődő brevikán pozitív sávot figyeltünk meg. (c) A brevikán reakciót (piros), *MAP2* elleni antitest alkalmazásával, a dendritek jelölésével (zöld) kombináltuk. A *MAP2* pozitivitás intraglomerularis dendritek jelenlétét mutatja, a dendritek mentén a brevikán pontszerű megjelenése

(piros) látható. **(d)** A brevikán reakciót (piros), neurofilament elleni antitest használatával, az axonok jelölésével (zöld) kombináltuk. A neurofilament reakció (zöld) az axonok intraglomerularis jelenlétét mutatja. **(e)** Az EPL-ben brevikán pozitív pontszerű struktúrák jelenléte figyelhető meg. **(f)** Kettős fluoreszcens jelölést követően megfigyeltük, hogy a brevikán pozitív gyöngyszerű struktúrák (piros) a neurofilament pozitív axonok (zöld) mentén helyezkednek el (*nyilak*).

Közvetlenül a GL alatt, az EPL felszínes rétegében erősen festődő brevikán pozitív sávot figyeltünk meg, míg a mélyebb rétegek csak gyenge festődést mutattak (23. a, b ábra). Az EPL nagyobb nagyításon történő vizsgálata során brevikán pozitív, a BO felszínére merőlegesen futó, gyöngyfüzérszerű mintázatot mutató struktúrákat figyeltünk meg (23. e ábra). A brevikán-neurofilament kettős jelölés eredményeként jól látható volt, hogy a brevikán pozitív pontszerű struktúrák az axonok mentén figyelhetők meg, mely jelenség a Ranvier-féle befűződések körüli nodalis ECM jelenlétére utal (23. f ábra). A mitralis sejtek körül gyakori volt a PNN vékony formájának előfordulása. Az IPL és a GCL intenzív brevikán reakciót mutatott, regionális különbségeket ezen területeken nem figyeltünk meg (23.a ábra).

#### **4.3.5. Neurokán**

A neurokán expressziója a BO minden rétegében megfigyelhető volt (24. a ábra). A glomerulusokon belül neurokán pozitív és negatív területek váltakozását detektáltuk. A glomerulusok festődése között jelentős különbség nem mutatkozott (24. a, b, d ábra). A legerősebb reakcióintenzitás az EPL területén volt megfigyelhető, különösképpen annak felszínes régiója mutatott erős festődést (24. a, b, c ábra). A IPL-ben mérsékelt, míg a GCL területén gyenge jelintenzitást tapasztaltunk (24. a ábra).

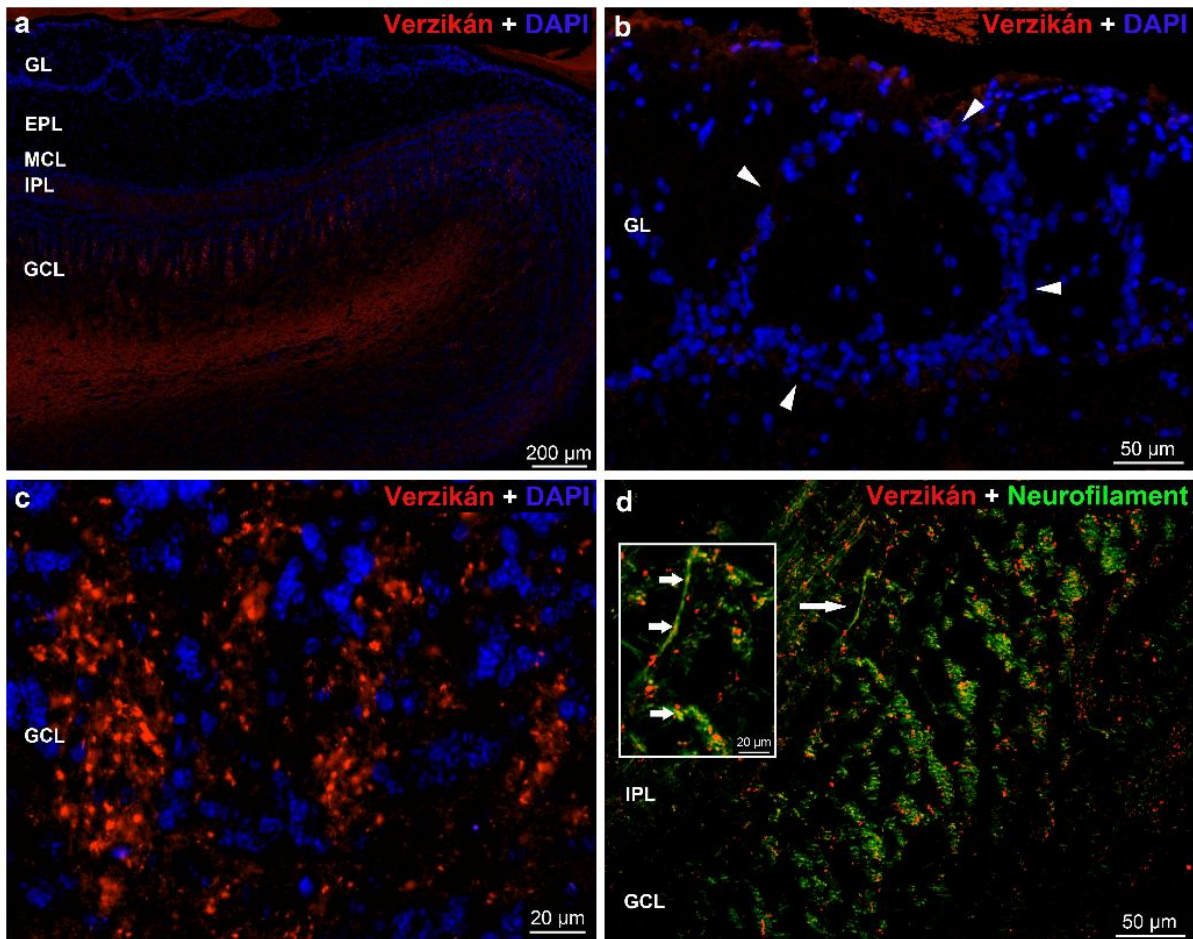


**24. ábra:** A neurokán eloszlása patkány BO területén. (a-d) A neurokán kimutatása antitestek segítségével történt, a neurokán reakciót *DAPI* magfestéssel kombináltuk. (a) Kis nagyítású felvétel, mely a neurokán eloszlását mutatja a BO egyes rétegein belül. *GL*: glomerularis réteg, *EPL*: külső plexiform réteg, *MCL*: mitralis sejtek rétege, *IPL*: belső plexiform réteg, *GCL*: granularis sejtek rétege. A b-d ábrán szereplő rövidítések jelentése megegyezik az előbbieken felsoroltakkal. (b, d) A nyílhegyek a periglomerularis térséget jelölik. (c) Az EPL kiemelkedően erős festődési intenzitást mutatott.

#### 4.3.6. Verzikán

A verzikán reakció szinte teljesen negatívnak bizonyult a GL-ben, az EPL-ben és a mitralis sejtek rétegében (25. a, b ábra). Az IPL és a GCL területén a verzikán jelölése jellegzetes, pontszerű megjelenést mutatott. A verzikán pozitív pontszerű struktúrák a GCL felszínes rétegében voltak jelen legnagyobb számban, ahol az eloszlásuk egyenetlen volt. A verzikán pozitív pontok mennyiségétől függően, egymással alternáló, világosabb és sötétebb oszlopokat figyelhattünk meg a BO ezen rétegében (25. a, c ábra). A neurofilament jelölés a verzikán reakcióhoz hasonló oszlopszerű mintázatot mutatott, a verzikán-neurofilament kettős jelölést követően pedig megfigyeltük, hogy a verzikán pozitív pontszerű struktúrák a

neurofilament elleni antitesttel jelölődött axonok mentén helyezkednek el (25. d ábra). A GCL mélyebb régiójában a neurofilament reakció intenzitása gyengének bizonyult, valamint a verzikán pozitív pontszerű képletek sűrűsége jelentősen csökkent (25. a, d ábra).

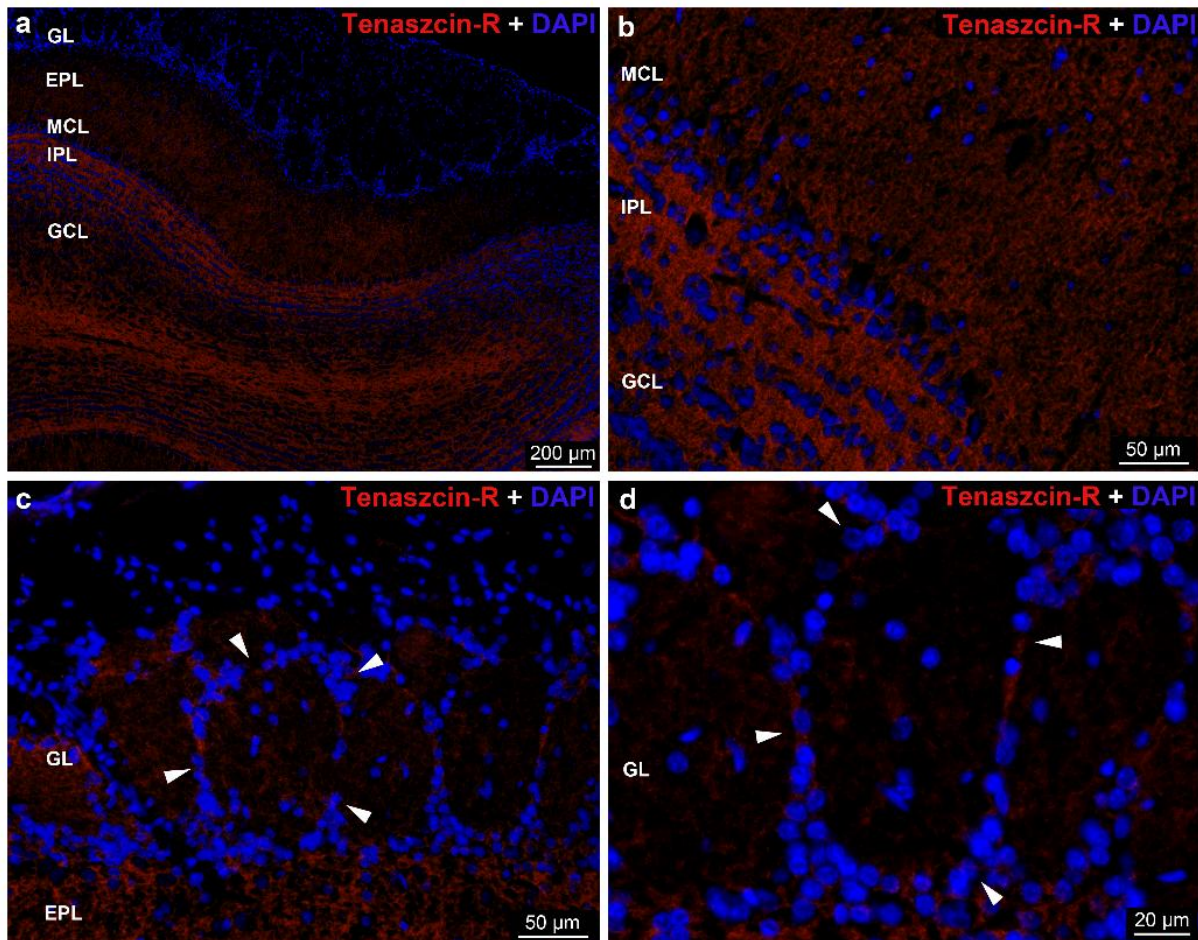


**25. ábra:** A verzikán eloszlása patkány BO területén. (a-d) A verzikán kimutatása antitestek segítségével történt, a verzikán reakciót *DAPI* magfestéssel kombináltuk. (a) Kis nagyítású felvétel, mely a verzikán eloszlását mutatja a BO egyes rétegein belül. *GL*: glomerularis réteg, *EPL*: külső plexiform réteg, *MCL*: mitralis sejtek rétege, *IPL*: belső plexiform réteg, *GCL*: granularis sejtek rétege. A b-d ábrán szereplő rövidítések jelentése megegyezik az előbbieken felsoroltakkal. (b) A nyílhegyek a periglomerularis térséget jelölik. (a, c, d) A GCL-ben jól látható a verzikán pozitív pontszerű struktúrák oszlopszerű elrendeződése. (d) A verzikán pozitív pontszerű képletek (nyilak), illetve a neurofilament elleni antitesttel jelölődött axonok kolokalizációja látható.

#### 4.3.7. Tenascin-R

A TN-R eloszlása és az immunreakció intenzitása eltérő volt a BO különböző rétegeiben (26. a ábra). A GCL csak mérsékelt festődést mutatott, míg az MCL majdnem negatívnak bizonyult erre a molekulára nézve. A GL-ben, mind a periglomerularis régióban, mind intraglomerularisan igen alacsony reakcióintenzitást figyeltünk meg, így ezeken a

képeken elsősorban a DAPI jelölés által megfestett periglomerularis térség látható (26. a, c, d ábra). A legintenzívebb festődést az IPL területén detektáltuk, míg az EPL-ben és a GCL-ben csak alacsony intenzitású jelet találtunk (26. a, b, c ábra).

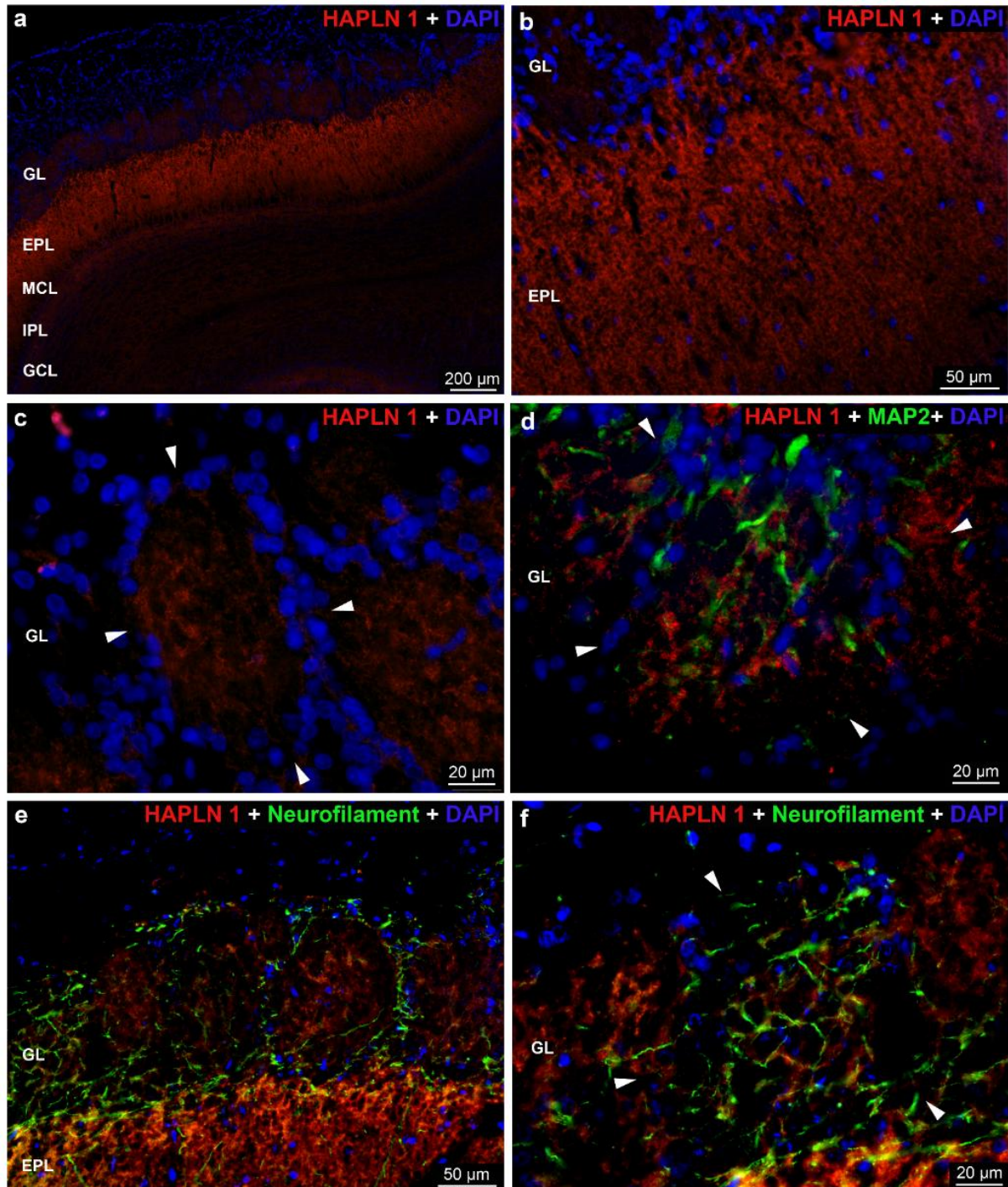


**26. ábra:** A TN-R eloszlása patkány BO területén. (a-d) A TN-R kimutatása antitestek segítségével történt, a TN-R reakciót DAPI magfestéssel kombináltuk. (a) Kis nagyítású felvétel, melyen látható, hogy a TN-R eloszlása eltérő a BO egyes rétegein belül. GL: glomerularis réteg, EPL: külső plexiform réteg, MCL: mitralis sejtek rétege, IPL: belső plexiform réteg, GCL: granularis sejtek rétege. A b-d ábrán szereplő rövidítések jelentése megegyezik az előbbieken felsoroltakkal. (b) A TN-R reakció az IPL területén mutatott legintenzívebb festődést, az EPL-ben és a GCL-ben csak alacsony intenzitású jelet találtunk, míg az MCL szinte teljesen negatívnak bizonyult erre a molekulára nézve. (c, d) A GL-ben, mind a periglomerularis régióban, mind intraglomerularisan igen alacsony reakcióintenzitást figyeltünk meg. A nyílhegyek a periglomerularis térséget jelölik, mely élénken kirajzolódik a DAPI festés következtében.

#### 4.3.8. HAPLN1

A HAPLN1 eloszlása egyenetlennek bizonyult a glomerulusokon belül, valamint a különböző glomerulusok területén tapasztalt reakcióintenzitás is meglehetősen eltérő volt (27. a, c ábra). A MAP2 és neurofilament elleni antitestek pozitív reakciót mutattak a HAPLN1

pozitivitást mutató területek között (27. d, e, f ábra). A HAPLN1-neurofilament dupla jelölést követően készült szuper-rezolúciós felvételeken AC-ok jelenléte figyelhető meg (22. f ábra). A periglomerularis térségben gyenge jelet detektáltunk (27. c ábra). A legintenzívebb reakciót az EPL-ben figyeltük meg, az IPL területén gyenge jelet kaptunk, míg a GCL negatív volt HAPLN1-re nézve (27. a, b ábra).



**27. ábra:** A HAPLN1 eloszlása patkány BO területén. (a-c) A HAPLN1 jelölését (piros) DAPI magfestéssel (kék) kombináltuk. (a) A HAPLN1 eloszlása a BO egyes rétegein belül. GL: glomerularis réteg, EPL: külső

plexiform réteg, *MCL*: mitralis sejtek rétege, *IPL*: belső plexiform réteg, *GCL*: granularis sejtek rétege. **(b)** A legintenzívebb reakciót az EPL-ben figyeltük meg. **(c)** A reakció intenzitása egyenetlennek bizonyult a glomerulusokon belül, valamint a különböző glomerulusok területén tapasztalt reakcióintenzitás is meglehetősen eltérő volt. A periglomerularis térségben gyenge jelet detektáltunk. **(d)** A HAPLN1 és a sejtmagok jelölése mellett a dendriteket is feltüntettük MAP2 elleni antitesttel (a képen zöld színnel látható). **(e-f)** A HAPLN1 és a sejtmagok jelölése mellett az axonokat is feltüntettük neurofilament elleni antitesttel (a képen zöld színnel látható). **(c, d, f)** A *nyílhegyek* a periglomerularis térséget jelzik. A MAP2 és neurofilament elleni antitestek pozitív reakciót mutattak a HAPLN1 pozitivitást mutató területek között. A HAPLN1-neurofilament dupla jelölésről készült szuper-rezolúciós felvételeken 'axonal coat'-ok jelenléte figyelhető meg (22. f ábra).

**7. táblázat: Az ECM molekulák rétegenkénti eloszlásának szemikvantitatív kiértékelése a bulbus olfactorius területén**

	HA	WFA	Aggrekán	Brevikán	Neurokán	Verzikán	TN-R	HAPLN1
Glomerularis réteg, glomerulusok	++	+++ /++++**§	++ /+++**§	+**	++	-	-/+	+ /++§**
Glomerularis réteg, periglomerularis tér	+++	-/+	++ /+++	+++	++	-	-/+	-
Külső plexiform réteg, külső rész	+++	-/+	+++	+++ #	++++	-	+	+++
Külső plexiform réteg, belső rész	++	++	-	++ #	+++	-	++	+++
Mitralis sejtek rétege	+++*	+++*	+*	+++*	+*	-	+	-
Belső plexiform réteg	++	+++ /++++	+++	+++	++	#	+++	++
Granularis sejtek rétege, külső rész	++	+	-	+++	++	#	++	-
Granularis sejtek rétege, belső rész	++	+	-	+++	++	#	++	-

A festődési intenzitás kiértékeléséhez használt fokozatok:

- : nincs festődés
- + : gyenge festődés
- ++ : mérsékelt festődés
- +++ : erős festődés
- ++++: nagyon erős festődés

Az ECM megjelenési formáinak előfordulását jelölő írásjelek:

- \* : PNN előfordulása
- \*\* : axonal coat-ok előfordulása
- # : erősen festődő pontszerű struktúrák jelenléte a neuropilben
- § : az egyes glomerulusok festődési intenzitása között különbség látható

## 5. MEGBESZÉLÉS

Munkánk során hisztokémiai és immunhisztokémiai módszerek segítségével, elsőként írtuk le az ECM molekuláris összetételét és szerveződését az OI, a PHN és a BO területén. A vizsgált területek közös jellemvonása, hogy az ECM-et képző molekulák főként a neuropilben mutathatók ki, míg PNN kialakulása elsősorban a PHN magnocellularis részére jellemző. A kapott eredmények párhuzamot mutatnak azon irodalmi adatokkal, melyek szerint mindhárom terület nagyfokú synapticus plaszticitással rendelkezik, és egyben magyarázatul szolgálhatnak a neuronális kapcsolatok átrendeződése során lezajló folyamatokra. A precerebellaris magok esetében a neuronális kapcsolatok nagyfokú plasztikussága, a szintén magas fokú plaszticitással rendelkező vestibularis rendszerrel való kiterjedt kapcsolatuknak köszönhető. A BO-ban a szaglóhám szenzoros neuronjainak folyamatos megújulása következtében a neuronális kapcsolatok átrendeződése élethosszig tartó folyamat.

### 5.1 Az extracellularis mátrix és a synapticus plaszticitás kapcsolata

A PNN az ECM molekulák szövedéke, mely a központi idegrendszerben körülöleli számos neuron sejttestét és a dendritek proximalis részét. A neuronok synapticus kapcsolatai ezen molekulahálózatba ágyazódnak be, így a PNN lokalizációjánál fogva hatással van a synapticus kontaktusok fejlődésére és stabilizálására, illetve kifejlett korban molekuláris barriert képez a benövő axonok számára. Mindezek által a PNN-nek jelentős szerepe van egy adott központi idegrendszeri terület synapticus kapcsolatainak átrendezésére való képesség, vagyis a neuronális plaszticitás mértékének lokális kialakításában. A PNN a kései postnatalis fejlődés során alakul ki, mely folyamat párhuzamosan zajlik az ún. kritikus periódus záródásával. A kritikus periódus során a neuronok nagy hatásfokkal képesek átrendezni synapticus kapcsolataikat (Carulli és mtsai., 2020), lezárulását követően a neuronális plaszticitás drámaian csökken, mely jelenséget számos, a látó, motoros és somatoszenzoros rendszerre kiterjedő tanulmány alátámasztja (Barritt és mtsai., 2006; Massey és mtsai., 2006; Pizzorusso és mtsai., 2002). Általánosan elfogadott elképzelés, hogy kifejlett korban a PNN gátolja a neuronális plaszticitást, ezáltal az ECM pericellularis szerkezetének juvenilis formába történő visszaállítása elősegíti az axonok benövését és a sérült neuronok funkcionális regenerációját (Sorg és mtsai., 2016). Általánosságban elmondható, hogy a hialuronsav alkotja a PNN hálózatának gerincét. Ez a molekula embrionális korban mutat kiemelkedő expressziót, de a fokozott synapticus plaszticitást mutató területeken mennyisége kifejlett korban is jelentős. Kiváló példa erre a szaglórendszer, hiszen a szaglóhámiban található

elsődleges érzékszervek folyamatosan újraképződnek az élet során, és a glomerularis rétegbe belépő axonjaik új synapticus kapcsolatokat alakítanak ki, és/vagy a meglévők átrendeződését eredményezik a postsynapticus sejteken (Lledo és Saghatelyan, 2005; Ma és mtsai., 2017). A glomerulusokban és a periglomerularis területen megjelenő erőteljes HA expresszió permisszív milliőt jelent ezekben a folyamatokban. Számos tanulmány bizonyította, hogy a hialuronsavban gazdag környezet elősegíti a parvalbumin pozitív sejtek esetében a neuronok migrációját, érését és az axonok benövését, alátámasztva ezzel a hialuronsav synapticus plaszticitásra gyakorolt permisszív hatását (Margolis és mtsai., 1975; Preston és Sherman, 2011; Wakao és mtsai., 2011). A CSPG-ok közül az aggregán, a neurokán, a brevikán és a verzikán képezi a PNN fő alkotóelemeit, viszont fontos kiemelnünk, hogy míg a verzikán, a neurokán és a brevikán knock-out egerekben többnyire normál szerkezetű PNN volt megfigyelhető (Dours-Zimmermann és mtsai., 2009), addig az aggregán knock-out egerekből származó corticalis neuronok jelentős abnormalitásokat mutattak, jelezve az aggregán esszenciális szerepét a PNN kialakításában (Giamanco és mtsai., 2010). Az egyes ECM molekulák egyenlőtlen eloszlása a bulbus olfactorius glomerulusaiban szintén azt sugallja, hogy a különböző molekulák eltérő módon vesznek részt a synapticus plaszticitás kialakításában. Ezt az elképzelést megerősítik az aggregán és a brevikán eltérő expressziós dinamikáját leíró irodalmi adatok (Milev és mtsai., 1998; Zimmermann és Dours-Zimmerman, 2008). A tenascin család tagjai közül a tenascin-R kulcsfontosságú eleme a PNN-nek. Tenascin-R knock-out egerekben a PNN-t alkotó molekulák abnormális aggregációját figyelték meg. A PNN végleges szerkezetének stabilizálásában a link proteineknek van kiemelkedő szerepe (Fawcett, 2009). Eddigi ismereteink szerint a PNN három fő mechanizmuson keresztül szabályozza a neuronális plaszticitást (Wang és Fawcett, 2012): (1) fizikai barriert képezve megakadályozza új neuronális kapcsolat kialakulását (Barritt és mtsai., 2006; Corvetti és Rossi, 2005), (2) a kondroitin szulfát proteoglikánok által alkotott szerkezet kötőhelyet biztosít olyan molekulák számára, melyek gátolják új synapticus kontaktusok kialakulását (pl: semaphorin 3A) (Deepa és mtsai., 2006) és (3) gátolja az AMPA receptorok laterális diffúzióját a synapsisokban (Frischknecht és mtsai., 2009). Számos kísérlet bizonyította, hogy kondroitináz ABC-vel történő kezelés hatására a PNN kifejlett korra jellemző szerkezete felbomlik és visszaáll a juvenilis stádiumra jellemző állapot, mely a synapticus plaszticitás nagyfokú növekedéséhez vezet (Sorg és mtsai., 2016).

## **5.2 Az ECM molekulák eloszlása az oliva inferior, a nucleus prepositus hypoglossi és a bulbus olfactorius területén**

A BO és a nuclei precerebellares (OI, PHN) területén az elvégzett hisztokémiai és immunhisztokémiai módszerekkel minden általunk vizsgált ECM molekula kimutatható volt. Általános jellemvonása a három területnek, hogy az ECM molekulák elsősorban diffúz módon, a neuropil területén jelentek meg, melynek festődési intenzitása jelentős eltéréseket mutatott a különböző reakciók között, illetve az egyes molekulák expressziós mintázata eltérő volt a vizsgált területek rétegeiben/almagjaiban és inhomogenitás ezeken belül is felfedezhető volt. Az OI rostralis kétharmadában a reakciók intenzitása meglehetősen csekély regionális eltéréseket mutatott, ezzel ellentétben a mag caudalis harmadában az ECM festődésében megfigyelhető különbségek jóval szembetűnőbbek voltak. A PHN vizsgálata alapján általánosságban elmondható, hogy a két almag közül a magnocellularis részben volt erősebb a neuropil festődési intenzitása, míg a parvocellularis területen általában gyengébb jelet kaptunk. A BO rétegeiben figyelhető meg az ECM molekulák legvariábilisebb eloszlása, mely eredményeink alapján összefüggésbe hozható azzal a ténnyel, hogy rétegeinek felépítése igen változatos. A kondenzált ECM megjelenési formái közül mindhárom területen kimutatható volt az 'axonal coat' (AC). Az OI esetében ezen struktúrák minden almagban felfedezhetők voltak, míg a PHN területén elsősorban a magnocellularis alegységre voltak jellemzők. A BO esetében a GL-ben tudtunk azonosítani AC-ot. Az aggregán, a brevikán és a HAPLN1 mindhárom területen részt vett ezen struktúrák kialakításában. A kondenzált ECM másik jellegzetes megjelenési formája a nodalis ECM, mely szintén mindhárom területen kimutatható volt. A verzikán reakció jellegzetes pontszerű mintázata vélhetően a Ranvier-féle befűződések körüli nodalis ECM-et demonstrálja. A kondenzált ECM leggyakrabban vizsgált formája, a PNN kizárólag a PHN magnocellularis alegységére volt általánosan jellemző, a parvocellularis alegységben, valamint az OI területén szinte teljesen hiányzott. A BO esetében kizárólag a mitralis sejtekre volt jellemző vékony, pericellularis jelölődés.

### **5.2.1. Oliva inferior**

Az OI területén az ECM szerveződésének legszembetűnőbb sajátossága a PNN hiánya, amely összefüggésben lehet az itt található neuronok egyedi morfológiai és kapcsolatbeli tulajdonságaival. Mivel a synapsisok többsége a dendritek distalis részén kialakuló glomerulusokra korlátozódik (De Zeeuw és mtsai., 1998; Gwyn és mtsai., 1977), és a sejttesten, illetve a dendritek proximalis részén synapticus kapcsolatok csak elvétve láthatók,

feltételezhetjük, hogy nincs szükség a PNN synapsisokat stabilizáló hatására. Ugyanakkor figyelembe véve a synapsisok lokalizációját és az ECM synapticus kapcsolatokat stabilizáló szerepét, valószínű, hogy a neuropilben megfigyelt, erősen festődő, gyűrűszerű struktúrák az ECM glomerulusok körüli akkumulációját jelzik. Brückner és mtsai. 2008-ban 'axonal coat' (AC) néven először említették a kondenzált ECM axon terminálisok körül történő megjelenését mind gátló, mind serkentő synapsisok esetén. A neuropil területén általunk megfigyelt, gyűrűszerű struktúrák tehát valószínűleg az ECM ezen kondenzált megjelenési formáját reprezentálják. Eredményeink alapján elmondható, hogy az OI területén az AC molekuláris összetétele nagyfokú hasonlóságot mutat a basalis ganglionok, a corpus trapezoideum, a corpus geniculatum laterale, a thalamus, a vestibularis magok, a gerincvelő és a hippocampus területén leírtakkal, kiegészítve az irodalmi adatokat a TN-R jelenlétével (Blosa és mtsai., 2013; Brückner és mtsai., 2008; Gaál és mtsai., 2014; Jäger és mtsai., 2013; Rác és mtsai., 2014). A kondenzált ECM egy másik speciális megjelenési formáját a verzikán jelölésével tettük láthatóvá. A verzikán reakciót követően erősen festődő, pontszerű képletek jelentek meg a neuropil területén, melyek vélhetően a Ranvier-féle befűződések körül kialakuló nodalis ECM-et jelöli (Bekku és mtsai., 2009; Bekku és Oohashi, 2010; Rác és mtsai., 2014).

Az OI afferens kapcsolatokat tekintve visuomotoros-vestibularis, somatosensoros és integratív területekre osztható (Azizi és Woodward, 1987). A három, funkcionális szempontból eltérő régió közül a visuomotoros-vestibularis magok (DMCC, DC, nucleus  $\beta$ ) esetében tapasztaltuk az ECM molekulák legváltozatosabb eloszlását. A legszembevetőbb különbséget az aggregán esetében figyeltük meg, hiszen a DC negatívnak bizonyult ezen molekulára nézve, míg a DMCC és a nucleus  $\beta$  területén intenzív reakció volt megfigyelhető. Az aggregán az AC egyik esszenciális komponense, irodalmi adatok alapján feltételezhetjük, hogy a synapsisok stabilizálása által gátolja a központi idegrendszer kapcsolatainak átépülését (Frischknecht és mtsai., 2009; Morawski és mtsai., 2012; Pizzorusso és mtsai., 2002). Az aggregán hiánya a DC területén fokozhatja a synapticus plaszticitást az oculomotoros aktivitás során. A másik szembevető jelenség a neurokán expressziója kapcsán volt megfigyelhető: erőteljes reakcióintenzitást detektáltunk a nucleus  $\beta$  területén, ezzel szemben a DC és DMCC esetében vagy nagyon gyenge festődést mutattunk ki, vagy ezen területek teljesen negatívnak bizonyultak. A neurokán fokozott expressziója figyelhető meg prenatálisan és a korai postnatalis korban (Zimmermann és Dours-Zimmermann, 2008). Termelődése jelentősen csökken a második postnatalis héttől, bár expressziója a központi idegrendszer sérülését követően újra fokozódik (Asher és mtsai., 2000; Jones és mtsai., 2003). Egyre nagyobb számú

irodalmi adat támasztja alá, hogy az ECM érése a fejlődés során jelentősen korlátozza a központi idegrendszer plaszticitását, mely folyamat részét képezi a neurokán expressziójának születést követő csökkenése is (Galtrey és Fawcett, 2007; Rauch, 2004; Zimmermann és Dours-Zimmermann, 2008). Bár a DC, nucleus  $\beta$  és DMCC almagok funkcionális tekintetben ugyanazon csoportba tartoznak, az aggregán és a neurokán immunoreaktivitásában a fent leírtak szerint jelentős eltérések figyelhetők meg, melyek az alábbi morfológiai, illetve funkcionális különbségekre vezethetők vissza: (1) A DC neuronok két, vastag, hosszú dendrittel rendelkeznek, míg a DMCC és a nucleus  $\beta$  sejtjeinek számos, vékony dendritje van, melyek radiális orientációt mutatnak. (2) A DC, a DMCC, illetve a nucleus  $\beta$  neuronjainak flocculuson belül megfigyelhető projekciós területei nincsenek átfedésben. (3) Az otolith szervekből származó ingerület a DMCC és a nucleus  $\beta$  almagokba fut be (Barmack és Yakhnitsa, 2000; Swenson és Castro, 1983 a,b), míg a canalis semicircularis horizontalis a DC, a MAO horizontalis lamellája és a DMCC területével áll kapcsolatban (Lai és mtsai., 2010). (4) A DC neuronjai elsősorban a PHN felől kapnak GABAerg bemenetet, míg a DMCC és a nucleus  $\beta$  számára a vestibularis rendszerrel kapcsolatban álló nucleus solitarius körüli neuronok biztosítanak gátló impulzusokat. (5) A DC neuronok a vestibulo-ocularis és az optokinetikus reflex működésében játszanak szerepet, míg a nucleus  $\beta$  a szakkádikus szemmozgások kialakításának háttérben álló neuronális hálózat részét képezik (Ito, 2013; Raymond és Lisberger, 1998). A somatosensoros magok (DAO, MAO horizontalis lamellája) területén az ECM expressziós mintázata csekély eltéréseket mutatott. Annak ellenére, hogy az OI integratív részét képező magok (PO, MAO rostralis lamellája) kapcsolatrendszere jelentősen eltér, az ECM molekulák eloszlása ezeken a területeken is azonosnak bizonyult (Azizi és Woodward, 1987; Swenson és Castro, 1983 a,b; Walberg, 1974).

Szembetűnő jelenség, hogy az aggregán reakció intenzitása igen erős volt az integratív magcsoport részét képező PO területén, míg a visuomotoros DC esetében nem tudtunk jelet detektálni. Ez részben magyarázható a két almag közötti funkcionális különbséggel, valamint azon irodalmi adatokkal, melyek szerint a két mag neuronjainak elektrofiziológiai tulajdonságai jelentős különbségeket mutatnak. In vitro patch-clamp módszerrel kimutatták, hogy a DC neuronokban, ellentétben a PO neuronokkal, hiányzik az alacsony küszöbű kalcium áram (T áram), a hiperpolarizáció aktiválta áram (I<sub>h</sub> áram) és a DC neuronok küszöb alatti ingerre nem mutatnak oscillációt. Továbbá, a DC neuronok ingerlését követően nemcsak az ingerelt neuron válaszol, hanem neuroncsoportok válasza figyelhető meg (Ito, 2013). Mindezek mellett fontos kiemelnünk, hogy a DC az egyetlen almagja az OI-nak, amely nem küld kollaterálisokat a kisagy magokhoz (Ruigrok és mtsai., 1992).

### 5.2.2. Nucleus prepositus hypoglossi

Eredményeink alapján elmondható, hogy az OI-ral ellentétben, a PHN területén az ECM diffúz, illetve kondenzált megjelenési formái egyaránt megtalálhatók, továbbá, hogy a PHN magno- és parvocellularis része között az ECM molekulák expressziós mintázata különbségeket mutatott.

Leírtuk, hogy a PHN magnocellularis területén megfigyelhető PNN kialakításában az aggregán, a HA, a TN-R és a HAPLN1 vett részt, míg a parvocellularis terület esetében PNN vagy csak nagyon ritkán, vagy egyáltalán nem volt azonosítható. A CSPG-ok a PNN esszenciális részét képezik emlősök központi idegrendszerében (Carulli és mtsai., 2006; Dityatev és Schachner, 2003; Härtig és mtsai., 1992; Rác és mtsai., 2014; Zimmermann és Dours-Zimmermann, 2008). A vestibularis magokkal ellentétben, ahol a PNN kialakításában az aggregán, a brevikán, a neurokán és a verzikán is részt vesz (Rác és mtsai., 2014), a PHN magnocellularis területén kizárólag az aggregán jelenlétét tudtuk azonosítani. Közismert, hogy a CSPG-ok gátló hatással vannak a synapticus plaszticitásra és a központi idegrendszer regenerációjára (Dityatev és Rusakov, 2011). A PHN, összegző funkciója miatt, jelentős szerepet tölt be vestibuloocularis reflex horizontalis komponensének háttérében álló neuronális hálózat kialakításában, így feltételezhetjük, hogy a CSPG-ok további képviselőinek hiánya elősegíti ezen neuronhálózat nagyobb fokú plaszticitását, mely elengedhetetlen a folyamatos alkalmazkodáshoz a tekintet fixálása során (Galtrey és Fawcett, 2007; Pizzorusso és mtsai., 2002).

A PHN neuronjai neurokémiai tulajdonságaik alapján A, B, C és D típusba sorolhatók a különböző fajok esetében (Idoux és mtsai., 2006; Kolkman és mtsai., 2011; Shino és mtsai., 2008). Felnőtt patkányokban a neuronok túlnyomó többsége az A és B típusú sejtek közé tartozik, a két típus közel azonos számban fordul elő a mag területén (Idoux és mtsai., 2006). Neurokémiai vizsgálatok bizonyították, hogy az A típusú sejtek többsége GABAerg, míg a B típusú sejtek főként glutamatergek (Shino és mtsai., 2008). A glutamaterg sejtek többsége a magnocellularis almagban található, míg a GABAerg neuronok elsősorban a PHN parvocellularis részére korlátozódnak. Jelen munkánk során azt tapasztaltuk, hogy a PNN-el rendelkező neuronok túlnyomó többsége a magnocellularis alegységben helyezkedik el, így feltételezhetjük, hogy ezen sejtek a B típusú, glutamaterg neuronokat reprezentálják. Ez a megfigyelés összhangban áll azon előzetes kutatási eredményeinkkel, melyek szerint az MVN területén a magocellularis alegység glutamaterg neuronjai rendelkeznek PNN-el, míg a parvocellularis rész, főként GABAerg sejtjei körül nem figyelhető meg pericellularis jelölődés

(Rácz és mtsai., 2014). Ki kell emelnünk az MVN és a PHN magnocellularis részének funkcionális hasonlóságát: amellet, hogy egymással reciprok kapcsolatban állnak, projekciós területeik átfedésben vannak a szemmozgató agyidegi magok, a kisagy, a thalamus és a gerincvelő területén (Kolkman és mtsai., 2011; McCrea és mtsai., 1985). Továbbá mindkét mag parvocellularis részéről elmondható, hogy gátló interneuronjaik a locus ceruleus és az OI területére projiciálnak (Kolkman és mtsai., 2011).

### **5.2.3. Bulbus olfactorius**

Jelen munkánk során leírtuk, a központi idegrendszer felépítésében résztvevő, legjelentősebb ECM molekulák (HA, lektikánok, tenascin-R és a HAPLN1) szerveződését patkány BO területén. Az elvégzett hisztokémiai és immunhisztokémiai reakciók intenzitása és a festődés mintázata jelentős különbségeket mutatott a különböző rétegekben és az egyes rétegeken belül. Az ECM molekulák elsősorban a neuropil területén voltak kimutathatók, szerveződésükre mind a diffúz, mind a kondenzált megjelenési forma jellemző volt. Utóbbit elsősorban az AC-ok és a Ranvier befűződések körüli nodalis ECM-ek képviselik, míg PNN-t csak igen ritkán tudtunk azonosítani.

#### **5.2.3.1. Glomerularis réteg**

A GL-ben a WFA és az aggregán esetében tapasztaltuk a legerősebb reakcióintenzitást, ezt követte a HA, a neurokán és a HAPLN1 mérsékelt megjelenése. A leggyengébb reakciót a brevikán és a TN-R mutatta, míg a GL verzikánra nézve negatív volt. Mivel a verzikán és a TN-R a nodalis ECM esszenciális komponenseit képzik (Bekku és mtsai., 2009), ezen molekulák alacsony szintű expressziója, illetve hiánya valószínűleg a Ranvier-féle befűződések hiányára utal, mely jelenség magyarázható a nervus olfactorius mielinizálatlan axonjainak jelenlétével (Garcia-Gonzalez és mtsai., 2013). A GL egyik legszembetűnőbb jellemvonása az erősen és gyengén festődő glomerulusok váltakozása volt, mely jelenség megfigyelhető volt a WFA, az aggregán és a HAPLN1 reakciók esetében, és amelynek magyarázata további vizsgálatokat igényel. Egy másik szokatlan jellemvonása az intraglomerularis terület festődési mintázatának a foltszerűen festett és festetlen területek szabálytalan váltakozása. Az irodalmi adatokat és saját eredményeinket figyelembe véve kijelenthetjük, hogy az így kialakult mintázat az intraglomerularis 'ON', illetve 'non-ON' kompartmentek területét reprezentálja (Kosaka és mtsai., 1997; Kosaka és mtsai., 1998). Az 'ON' zónában a szaglóhám szenzoros sejtjei alakítanak ki axo-dendritikus synapsisokat a

célsejtjeikkel, míg a 'non-ON' zónában az interneuronok között jönnek létre dendrodendritikus synapticus kapcsolatok (Kosaka és Kosaka, 2005). A glomerulusok területén a WFA, az aggregán, a brevikán és a HAPLN1 reakció esetében számos AC fedezhető fel.

A periglomerularis térség festődési mintázata szintén eltérő volt az egyes reakciók esetében. A legerősebb reakcióintenzitást a HA és a brevikán esetében tapasztaltuk, mérsékelt jelerősség volt megfigyelhető a neurokán esetében, míg a WFA, az aggregán és a TN-R expressziója gyengének bizonyult. A verzikán és a HAPLN-1 jelenlétét nem tudtuk igazolni ezen a területen. Az ECM molekulák eltérő expressziós mintázata magyarázható a periglomerularis sejtek morfológiai, funkcionális és neurokémiai tulajdonságaival. Dendritjeik általában monoglomerularis végződést mutatnak, melyek intraglomerularis lefutása alapján 1-es, illetve 2-es típusú periglomerularis sejteket különböztethetünk meg (Nagayama és mtsai., 2014; Kosaka és mtsai., 1998). Hat különböző kémiai hírvivőt termelnek, amelyek közül négy (GABA, dopamin, enkephalin, thyreotrope-releasing hormone-TRH) a neuroaktív anyagok csoportjába, kettő (calretinin, calbindin) pedig a kalcium-kötő fehérjék csoportjába tartozik (Kosaka és mtsai., 1998). A HA domináns jelenléte összefüggésben lehet azzal, hogy a calretinint termelő periglomerularis sejtek érési ideje meglehetősen hosszú. Benito és mtsai. (2018) leírták, hogy ezen sejtek beépülése a már meglévő neuronális hálózatba meglehetősen limitált, inkább tartalékul szolgálnak a periglomerularis sejtek egyéb típusainak pótlására. A hialuronsavban gazdag környezet elősegíti a sejtek migrációját, az axonok benövését és a synapticus plaszticitást (Margolis és mtsai., 1975; Preston és Sherman, 2011; Wakao és mtsai., 2011). A brevikán fokozott expressziója valószínűsíthetően a periglomerularis régió már meglévő synapsisainak plaszticitását kontrollálja. Irodalmi adatok szerint a brevikán perisynapticus lokalizációja szabályozza a plaszticitás cellularis és synapticus formáját parvalbumin pozitív sejtekben, a kálium csatornák és az AMPA receptorok lokalizációjának szabályozása által (Favuzzi és mtsai., 2017). A PNN jelenléte nem zárható ki a periglomerularis térségben, viszont a szorosan egymás mellett elhelyezkedő sejtek megnehezítik az ECM molekulák pericellularis aggregációjának azonosítását.

### **5.2.3.2. Külső plexiform réteg**

A verzikán kivételével, az összes általunk vizsgált molekula pozitív reakciót mutatott az EPL területén. A legerősebb reakcióintenzitást a HA, az aggregán, a neurokán és a HAPLN1 esetében figyeltük meg, a brevikán és a WFA reakció mérsékeltlen erős jelet adott, míg a TN-R esetében gyenge jelölődést kaptunk. A mitralis és a pamacsos sejtek testének lokalizációja

és azok szekunder dendritjeinek kiterjedése alapján, az EPL egy külső/felszínes és egy belső/mély rétegre osztható (Mori és mtsai., 1983; Mouradian és Scott, 1988; Nagayama és mtsai., 2014; Orona és mtsai., 1984). Az említett dendritek eltérő synapticus kapcsolatokat hoznak létre az alrétegekben, amely maga után vonhatja az ECM molekulák egyenlőtlen eloszlását, speciális mikrokörnyezetet biztosítva az ott található synapsisok számára. A HA, az aggregán, a brevikán és a neurokán reakciók intenzívebbnek bizonyultak a külső rétegben. Ezen a ponton fontos megemlítenünk, hogy a HA és a brevikán szerepe bizonyított a parvalbumin pozitív sejtek érési folyamatában és a neuronoknak a lokálisan már kialakult neuronhálózatba való integrálásában. A parvalbumin pozitív sejtek a BO teljes területén megtalálhatók, de legnagyobb számban az EPL felszínes részében vannak jelen (Kosaka és mtsai., 1994; Kosaka és Kosaka, 2008).

Előzetes, a központi idegrendszer más területein végzett vizsgálataink során megfigyeltük, hogy az N-acetil-galaktóزامint kimutató WFA reakció (Giamanco és mtsai., 2010) mintázata és intenzitása nagymértékű hasonlóságot mutat az aggregán expressziós mintázatával. A BO területén az előzetes eredményekkel ellentétes képet kaptunk a két reakció esetében: míg az aggregán az EPL külső rétegében mutatott erősebb expressziót, addig a WFA reakció a mélyebb rétegben adott intenzívebb jelet. Ezen jelenség magyarázata további vizsgálatok elvégzését igényli.

Az EPL területén a neurokán igen erős festődést mutatott. Ezen molekuláról általánosságban elmondható, hogy a HA-hoz hasonlóan a juvenilis ECM esszenciális komponenseként elősegíti a neuronok migrációját, érését, az axon benövését és szintje a synapticus átrendeződésre való képesség beszűkülésével párhuzamosan drámaian csökken a korai postnatalis időszakban. A neurokán magas fokú expressziója a BO területén a szaglórendszer nagyfokú plasztikusságára utalhat (Milev és mtsai., 1998; Zimmermann és Dours-Zimmermann, 2008), és alátámasztja a molekula synapticus plaszticitásra gyakorolt permisszív hatását.

Az EPL-ben a brevikán jelölés jellegzetes pontszerű, a BO felszínére merőleges elrendeződést mutatott. A neurofilamenttel való kettős jelölés alapján feltételezhetjük, hogy a brevikán elsősorban a Ranvier-féle befűződések köré lokalizálódik.

### **5.2.3.3. Belső plexiform réteg**

A BO rétegei közül az IPL az egyetlen, amelyben az elvégzett ECM reakciók mindegyike pozitívnak bizonyult.

Erős reakcióintenzitás volt megfigyelhető a WFA és az aggregán esetében, mely jellegzetes festődési mintázattal párosult: a reakció elvégzését követően a BO felszínére merőleges lefutású, erősen festődő sávok jelentek meg ebben a rétegben. Anti-neurofilamenttel történő kettős jelölést követően megállapítottuk, hogy a WFA és aggregán pozitív sávok axonok köré lokalizálódnak, melyek feltételezhetően a mitralis sejtek axonjainak felelnek meg, de mivel ismereteink hiányosak az egyes ECM molekulák synapticus transzmisszióban és plaszticitásban betöltött szerepére vonatkozóan, a jellegzetes mintázat pontos okának feltárásához további vizsgálatok elvégzése szükséges. Valószínűsíthetően a jelenség összefüggésben lehet az IPL lokálisan kialakult bonyolult neuronhálózatának nagyfokú plaszticitásával.

A vizsgált molekulák közül ki kell emelnünk a TN-R-t, melynek expressziója az IPL területén volt a legerősebb, mérsékelt intenzitást tapasztaltunk a granularis rétegben, míg a felszínes rétegek vagy gyenge immunreaktivitást mutattak, vagy negatívnak bizonyultak ezen molekulára nézve. Ez az expressziós mintázat visszavezethető a molekula neurogenesisben betöltött szerepére, miszerint a TN-R indukálja az újonnan képződött neuroblastok radiális migrációját a BO területére. A TN-R erős expressziója a BO mélyebb rétegeiben korrelál a radiális migráció útvonalával és azokkal az irodalmi adatokkal, melyek szerint az újonnan képződött neuronok nagy része granularis és periglomerularis sejtekké differenciálódik (Sakamoto és mtsai., 2014).

#### **5.2.3.4. Granularis sejtek rétege**

A GCL-ben a legerősebb reakció a brevikán esetében volt látható, mérsékelt erősebb jelet figyeltünk meg a HA, a neurokán és a TN-R esetében, míg a WFA reakció gyenge jelet mutatott. Aggregánra és HAPLN1-re nézve a réteg negatívnak bizonyult. Az erős brevikán expresszió és az aggregán reakció negativitása arra enged következtetni, hogy a perisynapticus ECM fő komponense a brevikán, mely jelenséget korábban megfigyelték a cochlea belső szőrsejtjei körül kialakuló kehelyszerű synapsisok esetében (Sonntag és mtsai., 2018). A verzikán reakció eredményeként jellegzetes pontszerű, az axonok köré csoportosuló jelölődést kaptunk. Eredményeink tehát alátámasztják azon irodalmi adatokat, melyek szerint a verzikán a nodalis ECM egyik fő komponensét képezi (Cicanic és mtsai., 2012).

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Jelen munkánk során leírtuk az ECM legfőbb molekuláinak (HA, lektikánok, tenascin-R és HAPLN1) előfordulását és szerveződését az OI, a PHN és a BO területén, patkányban. Hisztokémiai és immunhisztokémiai reakciók segítségével a fent említett molekulák mindegyike kimutatható volt mindhárom vizsgált területen, viszont a molekulák megjelenése, szerveződése és a festődés intenzitása eltéréseket mutatott az egyes rétegek/almagok között, illetve bizonyos esetekben az egyes rétegeken/almagokon belül is.

Vizsgálataink alapján elmondhatjuk, hogy a két precerebellaris mag (OI és PHN) között jelentős különbségek figyelhetők meg az ECM szerveződését illetően. Az OI esetében a legszembetűnőbb jelenség a PNN hiánya, amely magyarázható azzal, hogy az OI neuronjainak sejttestén és proximalis dendritjein ritkán fordulnak elő synapsisok. A PHN magno- és parvocellularis része között is jelentős eltéréseket tapasztaltunk. Erős PNN volt megfigyelhető a magnocellularis almag neuronjainak többsége körül, míg a parvocellularis részben a pericellularis jelölődést nem tudtuk bizonyítani, az ECM kizárólag diffúz módon a neuropil területén jelent meg. Valószínűsítjük, hogy a két precerebellaris mag, valamint a PHN két almagja között megfigyelt különbségek összefüggésben vannak az említett területek afferens és efferens kapcsolatait, cytoarchitektúráját és fiziológiai tulajdonságait érintő különbségekkel, valamint azzal a ténnyel, hogy eltérő szerepet töltenek be a tekintet és a testhelyzet koordinálásában. Az ECM molekulák eloszlásának ismerete a precerebellaris magok területén normál körülmények között elengedhetetlenül szükséges ahhoz, hogy feltárjuk a vestibularis léziót követő kompenzáció során esetlegesen végbemenő változásokat a vestibularis magkomplex-szel kapcsolatban álló területeken.

A BO esetében azt tapasztaltuk, hogy a különböző ECM molekulák kimutatására elvégzett hisztokémiai és immunhisztokémiai reakciók elsősorban a neuropil területén mutattak pozitívítást. A PNN kizárólag vékony formában jelent meg és csak a mitralis sejtek körül volt megfigyelhető a WFA és az aggregán reakciót követően. Ezen eredmények összhangban vannak a szaglőrendszer neuronhálózatának élethosszig tartó átrendeződésével, mely a meglévő synapticus kapcsolatok felbomlásán és újraprendeződésén, valamint az interneuronok folyamatos képződésén és a BO-ba való bevándorlásán keresztül valósul meg. A PNN kifejlett korban gátolja a neuronális plaszticitást, mivel a pericellularis molekulaszövet akadályozza új synapticus kapcsolatok kialakulását és korlátozza a synapsisokban található receptorok motilitását. Tehát a PNN ritka megjelenése összefüggésben lehet a BO területén megfigyelhető kiemelkedő neuronális plaszticitással.

Eredményeink hozzájárulhatnak ahhoz, hogy megértsük az ECM neuronális plaszticitásban és regenerációban betöltött szerepét.

## SUMMARY

In the present study we have described the localization and organization of major ECM molecules, the hyaluronan, the lecticans, tenascin-R and HAPLN1 link protein in the inferior olive, prepositus hypoglossi and olfactory bulb of the rat. By using histochemical and immunohistochemical methods, we detected all of these molecules showing differences in the molecular composition, staining intensity, and organization of ECM between the layers or subnuclei and in some cases within a single layer or subnucleus of the examined structures.

Our results showed that the organization of ECM molecules is conspicuously different in the two precerebellar nuclei, PHN and IO. In case of the IO, the most characteristic finding was the lack of PNNs, presumably due to the absence of synapses on the perikarya and proximal dendrites of IO neurons. We detected markable differences between the magno- and parvocellular divisions of the PHN. PNNs were well developed in the magnocellular division of PHN, whereas the pericellular positivity was almost absent in the parvocellular division of PHN, here a diffuse ECM was observed. We suppose that the difference in the ECM pattern of the two precerebellar nuclei and between the two subnuclei of the PHN could be associated with their different afferent and efferent connections, cytoarchitecture, physiological properties and with their different functions in gaze and posture control. The knowledge on the distribution of various ECM molecules in the intact IO and PHN may help to follow the yet unknown changes of the ECM expression in the neuronal network of vestibular system during the vestibular compensation.

In the OB, one of the striking features of ECM staining pattern was that the reactions were shown dominantly in the neuropil. PNNs were present only in the mitral cell layer with the WFA and aggrecan staining and they exhibited only the thin appearance, whereas the other forms of condensed ECM were not recognizable. These results are in agreement with the life-long plasticity of the olfactory system which includes formation and elimination of synaptic contacts and continuous generation and migration of interneurons into the OB. The PNNs limit the plasticity in adulthood by altering new neuronal contacts, acting as a scaffold for molecules that can inhibit synapse formation, and limiting receptor motility at synapses. As the PNN limits the neural plasticity, its rare appearance may be related to the high degree of plasticity in the OB.

Our results might contribute to understand the recently highlighted importance of ECM in the neural plasticity and regeneration.

## 7. IRODALOMJEGYZÉK

- Asher RA, Morgenstern DA, Fidler PS, Adcock KH, Oohira A, Braistead JE, Levine JM, Margolis RU, Rogers JH, Fawcett JW (2000) Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokinetreated astrocytes. *J Neurosci* 20 (7):2427–2438.
- Azizi SA, Woodward DJ (1987) Inferior olivary nuclear complex of the rat: morphology and comments on the principles of organization within the olivocerebellar system. *J Comp Neurol* 263 (4):467–484.
- Bandtlow CE, Zimmermann DR (2000) Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev* 80 (4):1267–90.
- Barritt AW, Davies M, Marchand F, Hartley R, Grist J, Yip P, McMahon SB, Bradbury EJ (2006) Chondroitinase ABC promotes sprouting of intact and injured spinal systems after spinal cord injury. *J Neurosci* 26 (42):10856– 10867.
- Barmack NH, Yakhnitsa V (2000) Vestibular signals in the parasolitary nucleus. *J Neurophysiol* 83 (6):3559–3569.
- Bekku Y, Su WD, Hirakawa S, Fässler R, Ohtsuka A, Kang JS, Sanders J, Murakami T, Ninomiya Y, Oohashi T (2003) Molecular cloning of Bral2, a novel brain-specific link protein, and immunohistochemical colocalization with brevican in perineuronal nets. *Mol Cell Neurosci* 24 (1):148–159.
- Bekku Y, Rauch U, Ninomiya Y, Oohashi T (2009) Brevican distinctively assembles extracellular components at the large diameter nodes of Ranvier in the CNS. *J Neurochem* 108 (5):1266–1276.
- Bekku Y, Oohashi T (2010) Neurocan contributes to the molecular heterogeneity of the perinodal ECM. *Arch Histol Cytol* 73 (2):95–102.
- Benito N, Gaborieau E, Sanz Diez A, Kosar S, Foucault L, Raineteau O, De Saint JD (2018) A pool of postnatally generated interneurons persists in an immature stage in the olfactory bulb. *J Neurosci* 38 (46):9870–9882.
- Blosa M, Sonntag M, Brückner G, Jäger C, Seeger G, Matthews RT, RübSamen R, Arendt T, Morawski M (2013) Unique features of extracellular matrix in the mouse medial nucleus of trapezoid body-- implications for physiological functions. *Neuroscience* 228:215–34.
- Brodal A (1984) The vestibular nuclei in the macaque monkey. *J Comp Neurol* 227 (2):252–266.
- Brown PA (1980) The inferior olivary connections to the cerebellum in the rat studied by retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *Brain Res Bull* 5 (3):267–275.
- Brunjes PC, Illig KR, Meyer EA (2005) A field guide to the anterior olfactory nucleus (cortex). *Brain Res Rev* 50 (2):305–335.
- Brückner G, Grosche J, Schmidt S, Härtig W, Margolis RU, Delpech B, Seidenbecher CI, Czaniera R, Schachner M (2000) Postnatal development of perineuronal nets in wild-type mice and in a mutant deficient in tenascin-R. *J Comp Neurol* 428 (4):616–629.
- Brückner G, Morawski M, Arendt T (2008) Aggrecan-based extracellular matrix is an integral part of the human basal ganglia circuit. *Neuroscience* 151 (2):489–504.
- Butler WN, Taube JS (2015) The nucleus prepositus hypoglossi contributes to head direction cell stability in rats. *J Neurosci* 35 (6):2547–2558.

- Cañas N, Valero T, Villarroya M, Montell E, Vergés J, García AG, López MG (2007) Chondroitin sulfate protects SH-SY5Y cells from oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. *J Pharmacol Exp Ther* 323 (3):946-953.
- Carulli D, Rhodes KE, Brown DJ, Bonnert TP, Pollack SJ, Oliver K, Strata P, Fawcett JW (2006) Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components. *J Comp Neurol* 494 (4):559–577.
- Carulli D, Broersen R, de Winter F, Muir EM, Mešković M, de Waal M, de Vries S, Boele HJ, Canto CB, De Zeeuw CI, Verhaagen J (2020) Cerebellar plasticity and associative memories are controlled by perineuronal nets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117 (12):6855-6865.
- Cicanic M, Sykova E, Vargova L (2012) Bral1: "Superglue" for the extracellular matrix in the brain white matter. *Int J Biochem Cell Biol* 44 (4):596-9.
- Corvetti L, Rossi F (2005) Degradation of chondroitin sulfate proteoglycans induces sprouting of intact purkinje axons in the cerebellum of the adult rat. *J Neurosci* 25 (31):7150–7158.
- Costa C, Tortosa R, Domènech A, Vidal E, Pumarola M, Bassols A (2007) Mapping of aggrecan, hyaluronic acid, heparan sulphate proteoglycans and aquaporin 4 in the central nervous system of the mouse. *J Chem Neuroanat* 33 (3):111-23.
- DeAngelis PL (1999) Hyaluronan synthases: fascinating glycosyltransferases from vertebrates, bacterial pathogens, and algal viruses. *Cell Mol Life Sci* 56 (7-8):670-682.
- Deák Á, Bácskai T, Gaál B, Rácz É, Matesz K (2012) Effect of Unilateral Labyrinthectomy on the Molecular Composition of Perineuronal Nets in the Lateral Vestibular Nucleus of the Rat. *Neurosci Lett* 513 (1):1-5.
- Deepa SS, Carulli D, Galtrey C, Rhodes K, Fukuda J, Mikami T, Sugahara K, Fawcett JW (2006) Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: a different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans. *J Biol Chem* 281 (26):17789-17800.
- Dembitskaya YV, Tyurikova OV, Semyanov AV (2016) The Role of the Brain Extracellular Matrix in Synaptic Plasticity After Brain Injuries (Review). *Neuroscience Research* 8 (4): 260-268.
- de Winter F, Kwok JCF, Fawcett JW, Vo TT, Carulli D, Verhaagen J (2016) The Chemorepulsive Protein Semaphorin 3A and Perineuronal Net-Mediated Plasticity. *Neural Plast* 2016:3679545.
- De Zeeuw CI, Gerrits NM, Voogd J, Leonard CS, Simpson JI (1994) The rostral dorsal cap and ventrolateral outgrowth of the rabbit inferior olive receive a GABAergic input from dorsal group Y and the ventral dentate nucleus. *J Comp Neurol* 341 (3):420–432.
- De Zeeuw CI, Ruigrok TJ, Holstege JC, Jansen HG, Voogd J (1990) Intracellular labeling of neurons in the medial accessory olive of the cat: II. Ultrastructure of dendritic spines and their GABAergic innervation. *J Comp Neurol* 300 (4):478–494.
- De Zeeuw CI, Simpson JI, Hoogenraad CC, Galjart N, Koekkoek SK, Ruigrok TJ (1998) Microcircuitry and function of the inferior olive. *Trends Neurosci* 21 (9):391–400.
- Dityatev A, Schachner M (2003) Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 4 (6):456–468.
- Dityatev A, Fellin T (2008) Extracellular matrix in plasticity and epileptogenesis. *Neuron Glia Biol* 4 (3):235–247.

- Dityatev A, Rusakov DA (2011) Molecular Signals of Plasticity at the Tetrapartite Synapse. *Curr Opin Neurobiol* 21 (2):353-9.
- Dours-Zimmermann MT, Zimmermann DR (1994) A novel glycosaminoglycan attachment domain identified in two alternative splice variants of human versican. *J Biol Chem* 269 (52):32992-32998.
- Dours-Zimmermann MT, Maurer K, Rauch U, Stoffel W, Fässler R, Zimmermann DR (2009) Versican V2 assembles the extracellular matrix surrounding the nodes of ranvier in the CNS. *J Neurosci* 29 (24):7731–7742.
- Ennis M, Hayar A (2008) Physiology of the main olfactory bulb. *The Senses: A Comprehensive Reference*, 4: 641–686.
- Eyre MD, Antal M, Nusser Z (2008) Distinct deep short-axon cell subtypes of the main olfactory bulb provide novel intrabulbar and extrabulbar GABAergic connections. *J Neurosci* 28 (33):8217-8229.
- Faissner A, Pyka M, Geissler M, Sobik T, Frischknecht R, Gundelfinger ED, Seidenbecher C (2010) Contributions of astrocytes to synapse formation and maturation—potential functions of the perisynaptic extracellular matrix. *Brain Res Rev* 63 (1–2):26–38.
- Favuzzi E, Marques-Smith A, Deogracias R, Winterflood CM, Sanchez-Aguilera A, Mantoan L, Maeso P, Fernandes C, Ewers H, Rico B (2017) Activity-dependent gating of parvalbumin interneuron function by the perineuronal net protein brevican. *Neuron* 95 (3):639–655.
- Fawcett J (2009) Molecular control of brain plasticity and repair. *Prog Brain Res* 175:501–509.
- Fawcett JW (2015) The extracellular matrix in plasticity and regeneration after CNS injury and neurodegenerative disease. *Prog Brain Res* 218:213–226.
- Figueres-Oñate M, Gutiérrez Y, López-Mascaraque L (2014) Unraveling Cajal's view of the olfactory system. *Front Neuroanat* 8:55.
- Flaumenhaft R, Rifkin DB (1991) Extracellular matrix regulation of growth factor and protease activity. *Curr Opin Cell Biol* 3 (5):817-23.
- Frischknecht R, Seidenbecher CI (2008) The crosstalk of hyaluronan-based extracellular matrix and synapses. *Neuron Glia Biology* 4 (3): 249-257.
- Frischknecht R, Heine M, Perrais D, Seidenbecher CI, Choquet D, Gundelfinger ED (2009) Brain Extracellular Matrix Affects AMPA Receptor Lateral Mobility and Short-Term Synaptic Plasticity. *Nat Neurosci* 12 (7):897-904.
- Fukushima K, Kaneko CR (1995) Vestibular integrators in the oculomotor system. *Neurosci Res* 22 (3): 249–258.
- Gaál B, Racz E, Juhasz T, Holló K, Matesz K (2014) Distribution of extracellular matrix macromolecules in the vestibular nuclei and cerebellum of the frog, *Rana esculenta*. *Neuroscience* 258:162-173.
- Galtrey CM, Fawcett JW (2007) The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain Res Rev* 54 (1):1–18.
- Galtrey CM, Kwok JC, Carulli D, Rhodes KE, Fawcett JW (2008) Distribution and synthesis of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan, link proteins and tenascin- R in the rat spinal cord. *Eur J Neurosci*. 27(6):1373-1390.
- Garcia-Gonzalez D, Murcia-Belmonte V, Clemente D, De Castro F (2013) Olfactory system and demyelination. *Anat Rec (Hoboken)* 296 (9):1424-1434.

- Giamanco KA, Morawski M, Matthews RT (2010) Perineuronal net formation and structure in aggrecan knockout mice. *Neuroscience* 170 (4):1314–1327.
- Gundelfinger ED, Frischknecht R, Choquet D, Heine M (2010) Converting juvenile into adult plasticity: a role for the brain's extracellular matrix. *Eur J Neurosci* 31 (12):2156-2165.
- Gwyn DG, Nicholson, Flumerfelt BA (1977) The inferior olivary nucleus of the rat: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 174 (3):489–520.
- Härtig W, Brauer K, Brückner G (1992) Wisteria Floribunda Agglutinin-Labelled Nets Surround Parvalbumin-Containing Neurons. *Neuroreport* 3 (10):869-872.
- Härtig W, Derouiche A, Welt K, Brauer K, Grosche J, Mäder M, Reichenbach A, Brückner G (1999) Cortical neurons immunoreactive for the potassium channel Kv3.1b subunit are predominantly surrounded by perineuronal nets presumed as a buffering system for cations. *Brain Res* 842 (1): 15–29.
- Hirakawa S, Oohashi T, Su WD, Yoshioka H, Murakami T, Arata J, Ninomiya Y (2000) The brain link protein-1 (BRAL1): cDNA cloning, genomic structure, and characterization as a novel link protein expressed in adult brain. *Biochem Biophys Res Commun* 276 (3):982-989.
- Hoge GJ, Davidson KG, Yasumura T, Castillo PE, Rash JE, Pereda AE (2011) The extent and strength of electrical coupling between inferior olivary neurons is heterogeneous. *J Neurophysiol* 105 (3):1089–1101.
- Hrabetová S, Masri D, Tao L, Xiao F, Nicholson C (2009) Calcium diffusion enhance after cleavage of negatively charged components of brain extracellular matrix by chondroitinase ABC. *Journal of Physiology* 587 (16): 4029-4049.
- Idoux E, Serafin M, Fort P, Vidal PP, Beraneck M, Vibert N, Mühlethaler M, Moore LE (2006) Oscillatory and intrinsic membrane properties of guinea pig nucleus prepositus hypoglossi neurons in vitro. *J Neurophysiol* 96 (1):175–196.
- Imai T (2014) Construction of functional neuronal circuitry in the olfactory bulb. *Seminars in cell & developmental biology* 35:180-188.
- Isaacson JS, Strowbridge BW (1998) Olfactory reciprocal synapses: dendritic signaling in the CNS. *Neuron* 20 (4):749-761.
- Ito M (2013) Error detection and representation in the olivo-cerebellar system. *Front Neural Circuits* 22 (7):1.
- Jäger C, Lendvai D, Seeger G, Brückner G, Matthews RT, Arendt T, Alpár A, Morawski M (2013) Perineuronal and Perisynaptic Extracellular Matrix in the Human Spinal Cord. *Neuroscience* 238:168-84.
- Jones FS, Jones PL (2000) The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn* 218 (2):235-259.
- Jones LL, Margolis RU, Tuszynski MH (2003) The Chondroitin Sulfate Proteoglycans Neurocan, Brevican, Phosphacan, and Versican Are Differentially Regulated Following Spinal Cord Injury. *Exp Neurol* 182 (2):399-411.
- Kikuta S, Fletcher ML, Homma R, Yamasoba T, Nagayama S (2013) Odorant response properties of individual neurons in an olfactory glomerular module. *Neuron* 77 (6):1122-1135.
- Kitai ST, Mccrea RA, Preston RJ, Bishop GA (1977) Electrophysiological and horseradish peroxidase studies of precerebellar afferents to the nucleus interpositus anterior. I. Climbing fiber system. *Brain Res* 122 (2):197–214.

- Kolkman KE, Moghadam SH, du Lac S (2011) Intrinsic physiology of identified neurons in the prepositus hypoglossi and medial vestibular nuclei. *J Vestib Res* 21 (1):33–47.
- Kosaka K, Heizmann CW, Kosaka T (1994) Calcium-binding protein parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat olfactory bulb. 1. Distribution and structural features in adult rat. *Exp Brain Res* 99 (2):191–204.
- Kosaka K, Toida K, Margolis FL, Kosaka T (1997) Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb—II. Prominent differences in the intraglomerular dendritic arborization and their relationship to olfactory nerve terminals. *Neuroscience* 76 (3):775–786.
- Kosaka K, Toida K, Aika Y, Kosaka T (1998) How simple is the organization of the olfactory glomerulus?: the heterogeneity of so-called periglomerular cells. *Neurosci Res* 30 (2):101–110.
- Kosaka K, Kosaka T (2005) Synaptic organization of the glomerulus in the main olfactory bulb: compartments of the glomerulus and heterogeneity of the periglomerular cells. *Anat Sci Int* 80 (2):80–90.
- Kosaka T, Kosaka K (2008) Heterogeneity of parvalbumin-containing neurons in the mouse main olfactory bulb, with special reference to short-axon cells and betaIV-spectrin positive dendritic segments. *Neurosci Res* 60 (1):56–72.
- Kosaka T, Kosaka K (2011) "Interneurons" in the olfactory bulb revisited. *Neurosci Res* 69 (2):93–99.
- Kosaka T, Kosaka K (2016) Neuronal organization of the main olfactory bulb revisited. *Anatomical science international* 91 (2):115–127.
- Kwok JC, Carulli D, Fawcett JW (2011) In vitro modeling of perineuronal nets: hyaluronan synthase and link protein are necessary for their formation and integrity. *J Neurochem* 114 (5):1447–1459.
- Lai CH, Yiu CN, Lai SK, Ng KP, Yung KK, Shum DK, Chan YS (2010) Maturation of canal-related brainstem neurons in the detection of horizontal angular acceleration in rats. *J Comp Neurol* 518 (10):1742–1763.
- Lledo PM, Saghatelian A (2005) Integrating new neurons into the adult olfactory bulb: joining the network, life-death decisions, and the effects of sensory experience. *Trends Neurosci* 28 (5):248–254.
- Llinás RR (2014) The Olivo-Cerebellar System: A Key to Understanding the Functional Significance of Intrinsic Oscillatory Brain Properties. *Front Neural Circuits* 7:96.
- Luskin MB (1993) Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11 (1):173–189.
- Ma Q, Lu H, Xu Z, Zhou Y, Ci W (2017) Mouse olfactory bulb methylome and hydroxymethylome maps reveal noncanonical active turnover of DNA methylation. *Epigenetics* 12 (8):708–714.
- Macrides F, Schneider SP (1982) Laminar organization of mitral and tufted cells in the main olfactory bulb of the adult hamster. *J Comp Neurol* 208 (4):419–30.
- Malun D, Brunjes PC (1996) Development of olfactory glomeruli: temporal and spatial interactions between olfactory receptor axons and mitral cells in opossums and rats. *J Comp Neurol* 368 (1):1–16.
- Margolis RK, Margolis RU, Preti C, Lai D (1975) Distribution and metabolism of glycoproteins and glycosaminoglycans in subcellular fractions of brain. *Biochemistry* 14 (22):4797–4804.
- Massey JM, Hubscher CH, Wagoner MR, Decker JA, Amps J, Silver J, Onifer SM (2006) Chondroitinase ABC digestion of the perineuronal net promotes functional collateral sprouting in the cuneate nucleus after cervical spinal cord injury. *J Neurosci* 26 (16):4406–4414.

- Matesz C, Modis L, Halasi G, Szigeti ZM, Felszeghy S, Bacskai T, Szekely G (2005) Extracellular matrix molecules and their possible roles in the regeneration of frog nervous system. *Brain Res Bull* 66 (4-6):526–531.
- McCrea RA, Bishop GA, Kitai ST (1977) Electrophysiological and horseradish peroxidase studies of precerebellar afferents to the nucleus interpositus anterior. II. Mossy fiber system. *Brain Res* 122 (2):215–228.
- McCrea RA, Baker R (1985) Anatomical connections of the nucleus prepositus of the cat. *J Comp Neurol* 237 (3):377-407.
- McCrea RA, Strassman A, Highstein SM (1987a) Anatomical and physiological characteristics of vestibular neurons mediating the vertical vestibulo-ocular reflexes of the squirrel monkey. *J Comp Neurol* 264 (4):571–594.
- McCrea RA, Strassman A, May E, Highstein SM (1987b) Anatomical and physiological characteristics of vestibular neurons mediating the horizontal vestibulo-ocular reflex of the squirrel monkey. *J Comp Neurol* 264 (4):547–570.
- McCrea RA, Horn AK (2006) Nucleus prepositus. *Prog Brain Res* 151:205–230.
- McKeon RJ, Hoke A, Silver J (1995) Injury-induced proteoglycans inhibit the potential for laminin-mediated axon growth on astrocytic scars. *Exp Neurol* 136 (1): 32–43.
- Medina JF, Nores WL, Mauk MD (2002) Inhibition of Climbing Fibres Is a Signal for the Extinction of Conditioned Eyelid Responses. *Nature* 416 (6878):330-333.
- Merkle FT, Fuentealba LC, Sanders TA, Magno L, Kessar N, Alvarez-Buylla A (2014) Adult neural stem cells in distinct microdomains generate previously unknown interneuron types. *Nat Neurosci* 17 (2):207-214.
- Mészár Z, Felszeghy S, Veress G, Matesz K, Székely G, Módis L (2008) Hyaluronan accumulates around differentiating neurons in spinal cord of chicken embryos. *Brain Res Bull* 75 (2-4):414–418.
- Milev P, Maurel P, Chiba A, Mevissen M, Popp S, Yamaguchi Y, Margolis RK, Margolis RU (1998) Differential regulation of expression of hyaluronan-binding proteoglycans in developing brain: aggrecan, versican, neurocan, and brevican. *Biochem Biophys Res Commun* 247 (2):207-12.
- Mombaerts P, Wang F, Dulac C, Vassar R, Chao SK, Nemes A, Mendelsohn M, Edmondson J, Axel R (1996) The molecular biology of olfactory perception. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 61:135-145.
- Morawski M, Brückner MK, Riederer P, Brückner G, Arendt T (2004) Perineuronal nets potentially protect against oxidative stress. *Exp Neurol* 188 (2):309-315.
- Morawski M, Brückner G, Arendt T, Matthews RT (2012) Aggrecan: beyond cartilage and into the brain. *Int J Biochem Cell Biol* 44 (5):690–693.
- Mori K, Kishi K, Ojima H (1983) Distribution of dendrites of mitral, displaced mitral, tufted, and granule cells in the rabbit olfactory bulb. *J Comp Neurol* 219 (3):339-355.
- Morita S, Oohira A, Miyata S (2010) Activity-dependent remodeling of chondroitin sulfate proteoglycans extracellular matrix in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Neuroscience* 166 (4):1068–1082.
- Mouradian LE, Scott JW (1988) Cytochrome oxidase staining marks dendritic zones of the rat olfactory bulb external plexiform layer. *J Comp Neurol* 271 (4):507-518.

- Mörgelin M, Paulsson M, Malmström A, Heinegård D (1989). Shared and distinct structural features of interstitial proteoglycans from different bovine tissues revealed by electron microscopy. *J Biol Chem* 264 (20):12080-90.
- Nagayama S, Homma R, Imamura F (2014) Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Front Neural Circuits* 8:98.
- Nieuwenhuys R, ten Donkelaar HJ, Nicholson C (1998) *The Central Nervous System of the Vertebrates*. Chapter 22: Mammals, 1884-1897.
- Orona E, Rainer EC, Scott JW (1984) Dendritic and axonal organization of mitral and tufted cells in the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 226 (3):346-356.
- Parrish-Aungst S, Shipley MT, Erdelyi F, Szabo G, Puche AC (2007) Quantitative analysis of neuronal diversity in the mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol* 501 (6):825-836.
- Paxinos G, Watson C (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Fourth Edition.
- Persohn E, Pollerberg GE, Schachner M (1989) Immunoelectron-microscopic localization of the 180 kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM in postsynaptic membranes. *J Comp Neurol* 288 (1):92-100.
- Pinching AJ, Powell TP (1971a) The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 9 (2): 305–345.
- Pinching AJ, Powell TP (1971b) The neuropil of the glomeruli of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 9 (2): 347–377.
- Pinching AJ, Powell TP (1971c) The neuropil of the periglomerular region of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 9 (2):379-409.
- Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW, Maffei L (2002) Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science* 298 (5596):1248-51.
- Pizzorusso T, Medini P, Landi S, Baldini S, Berardi N, Maffei L (2006) Structural and functional recovery from early monocular deprivation in adult rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (22):8517-22.
- Popp S, Andersen JS, Maurel P, Margolis RU (2003) Localization of aggrecan and versican in the developing rat central nervous system. *Dev Dyn* 227 (1):143-9.
- Preston M, Sherman LS (2011) Neural stem cell niches: roles for the hyaluronan-based extracellular matrix. *Front Biosci (Schol Ed)* 3:1165–1179.
- Rauch U (2004) Extracellular matrix components associated with remodeling processes in brain. *Cell Mol Life Sci* 61 (16):2031-2045.
- Raymond JL, Lisberger SG (1998) Neural learning rules for the vestibulo-ocular reflex. *J Neurosci* 18 (21):9112–9129.
- Rácz E, Gaál B, Kecskes S, Matesz C (2014) Molecular composition of extracellular matrix in the vestibular nuclei of the rat. *Brain Struct Funct* 219 (4):1385-1403.
- Ressler KJ, Sullivan SL, Buck LB (1994) Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell* 79 (7):1245-55.
- Rhodes KE, Fawcett JW (2004) Chondroitin sulphate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS? *J Anat* 204 (1):33-48.
- Rolls A, Shechter R, Schwartz M (2009) The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nat Rev Neurosci* 10 (3): 235–241.

- Ruigrok TJ, Osse RJ, Voogd J (1992) Organization of Inferior Olivary Projections to the Flocculus and Ventral Paraflocculus of the Rat Cerebellum. *J Comp Neurol* 316 (2):129-150.
- Sakamoto M, Ieki N, Miyoshi G, Mochimaru D, Miyachi H, Imura T, Yamaguchi M, Fishell G, Mori K, Kageyama R, Imayoshi I (2014) Continuous postnatal neurogenesis contributes to formation of the olfactory bulb neural circuits and flexible olfactory associative learning. *J Neurosci* 34 (17):5788-5799.
- Schoenfeld TA, Marchand JE, Macrides F (1985) Topographic organization of tufted cell axonal projections in the hamster main olfactory bulb: an intrabulbar associational system. *J Comp Neurol* 235 (4):503-18.
- Shino M, Ozawa S, Furuya N, Saito Y (2008) Membrane properties of excitatory and inhibitory neurons in the rat prepositus hypoglossi nucleus. *Eur J Neurosci* 27 (9):2413–2424.
- Shiple MT, Ennis M, Puche AC (2004) *The Rat Nervous System*, 3rd Edition, 923-953.
- Smith-Thomas LC, Stevens J, Fok-Seang J, Faissner A, Rogers JH, Fawcett JW (1995) Increased axon regeneration in astrocytes grown in the presence of proteoglycan synthesis inhibitors. *J Cell Sci* 108 (3): 1307–1315.
- Sonntag M, Blosa M, Schmidt S, Reimann K, Blum K, Eckrich T, Seeger G, Hecker D, Schick B, Arendt T, Engel J, Morawski M (2018) Synaptic coupling of inner ear sensory cells is controlled by brevican-based extracellular matrix baskets resembling perineuronal nets. *BMC Biol* 16 (1):99.
- Sorg BA, Berretta S, Blacktop JM, Fawcett JW, Kitagawa H, Kwok JC, Miquel M (2016) Casting a Wide Net: Role of Perineuronal Nets in Neural Plasticity. *J Neurosci* 36 (45):11459-11468.
- Spicer AP, McDonald JA (1998) Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family. *J Biol Chem* 273 (4):1923-1932.
- Spicer AP, Joo A, Bowling RA Jr (2003) A hyaluronan binding link protein gene family whose members are physically linked adjacent to chondroitin sulfate proteoglycan core protein genes: the missing links. *J Biol Chem* 278 (23):21083-21091.
- Spicer AP, Tien JY (2004) Hyaluronan and morphogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today* 72 (1):89-108.
- Stevens CF, Wesseling JF (1999) Augmentation is a potentiation of the exocytotic process. *Neuron* 22 (1):139-146.
- Swenson RS, Castro AJ (1983a) The afferent connections of the inferior olivary complex in rats. An anterograde study using autoradiographic and axonal degeneration techniques. *Neuroscience* 8 (2):259–275.
- Swenson RS, Castro AJ (1983b) The afferent connections of the inferior olivary complex in rats: a study using the retrograde transport of horseradish peroxidase. *Am J Anat* 166 (3):329–341.
- Szigeti ZM, Matesz C, Szekely G, Felszeghy S, Bácskai T, Halasi G, Mészár Z, Módis L (2006) Distribution of hyaluronan in the central nervous system of the frog. *J Comp Neurol* 496 (6):819–831.
- Tani E, Ametani T (1971) Extracellular distribution of ruthenium red-positive substance in the cerebral cortex. *J Ultrastruct Res* 34 (1):1-14.
- Toole BP (2000) Hyaluronan is not just a goo! *J Clin Invest* 106 (3):335-336.
- Toole BP (2004) Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer* 4 (7):528-539.
- Vecino E, Kwok JCF (2016) *The Extracellular Matrix in the Nervous System: The Good and the Bad Aspects. Chapter 5 Composition and Function of the Extracellular Matrix in the Human Body.*

- Wakao N, Imagama S, Zhang H, Tauchi R, Muramoto A, Natori T, Takeshita S, Ishiguro N, Matsuyama Y, Kadomatsu K (2011) Hyaluronan oligosaccharides promote functional recovery after spinal cord injury in rats. *Neurosci Lett* 488 (3):299–304.
- Walber F (1974) Descending Connections From the Mesencephalon to the Inferior Olive: An Experimental Study in the Cat. *Exp Brain Res* 20 (2):145-156.
- Wang D, Fawcett J (2012) The perineuronal net and the control of CNS plasticity. *Cell Tissue Res.* 349 (1):147-160.
- Wegner F, Hartig W, Bringmann A, Grosche J, Wohlfarth K, Zuschratter W, Bruckner G (2003) Diffuse perineuronal nets and modified pyramidal cells immunoreactive for glutamate and the GABA(A) receptor alpha1 subunit form a unique entity in rat cerebral cortex. *Exp Neurol* 184 (2):705–714.
- Zimmermann DR, Ruoslahti E (1989) Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican. *EMBO J* 8 (10):2975-81.
- Zimmermann DR, Dours-Zimmermann MT (2008) Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge. *Histochem Cell Biol* 130 (4):635–653.
- Zucker RS, Regehr WG (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64:355-405.



Nyilvántartási szám: DEENK/226/2020.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Hunyadi Andrea  
Neptun kód: B709AW  
Doktori Iskola: Idegtudományi Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10047549

## A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Hunyadi, A.**, Gaál, B. Á., Matesz, K., Mészár, Z. M., Morawski, M., Reimann, K., Lendvai, D., Alpár, A., Wéber, I., Rácz, É.: Distribution and classification of the extracellular matrix in the olfactory bulb.  
*Brain Struct. Funct.* 225 (1), 321-344, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00429-019-02010-8>  
IF: 3.298
2. Kecskés, S., Gaál, B. Á., Rácz, É., Birinyi, A., **Hunyadi, A.**, Matesz, K.: Extracellular matrix molecules exhibit unique expression pattern in the climbing fiber-generating precerebellar nucleus, the inferior olive.  
*Neuroscience*. 284, 412-421, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.09.080>  
IF: 3.231
3. Gaál, B. Á., Kecskés, S., Matesz, K., Birinyi, A., **Hunyadi, A.**, Rácz, É.: Molecular composition and expression pattern of the extracellular matrix in a mossy fiber-generating precerebellar nucleus of rat, the prepositus hypoglossi.  
*Neurosci. Lett.* 594, 122-126, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2015.03.056>  
IF: 2.107

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 8,636**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 8,636**

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

Debrecen, 2020.07.14.



## 8. TÁRGYSZAVAK

**Tárgyszavak:** neuronális plaszticitás, perineuronális háló, hialuronsav, kondroitin-szulfát proteoglikánok, tenascin-R, kapcsoló fehérje, vestibularis rendszer, agytörzs

**Key words:** neural plasticity, perineuronal net, hyaluronan, chondroitin sulfate proteoglycans, tenascin-R, link protein, vestibular system, brainstem

## 9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kísérleteimet a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetében végeztem. Ezúton szeretném megköszönni korábbi témavezetőmnek és laboratóriumunk korábbi vezetőjének, Dr. Matesz Klára egyetemi tanárnak és jelenlegi témavezetőmnek, Dr. Rácz Éva egyetemi adjunktusnak a rengeteg segítséget és hasznos tanácsot, amellyel munkámat támogatták és lehetővé tették a doktori értekezésem elkészülését.

Köszönetemet szeretném kifejezni az Anatómia Intézet korábbi igazgatójának, Dr. Antal Miklós egyetemi tanárnak és jelenlegi igazgatójának, Dr. Szücs Péter egyetemi docensnek, valamint Dr. Birinyi András egyetemi docensnek, laboratóriumunk jelenlegi vezetőjének, hogy a kísérletek elvégzéséhez lehetőséget biztosítottak az intézetben.

Szeretném megköszönni a kísérletek technikai kivitelezésében nyújtott sok segítséget elsősorban Horváth Tímeának, illetve a laboratórium minden dolgozójának.

A mikroszkópos felvételek elkészítésében nyújtott segítségért köszönet illeti Dr. Wéber Ildikó egyetemi tanársegédet és Dr. Mészár Zoltán egyetemi adjunktust.

Szeretném megköszönni az Anatómia Intézet minden munkatársának a segítséget és az együttműködést.

Végül, de nem utolsósorban, köszönöm családom minden tagjának a bizalmat és a rengeteg türelmet.