

**AZ EXTRACELLULÁRIS MAKROMOLEKULÁK SZEREPE A  
KÖZPONTI IDEGRENDSZER FEJLŐDÉSÉBEN**

**Mészár Zoltán**



**Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum  
Általános Orvostudományi Kar  
Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet**

**Debrecen, 2008**

# **AZ EXTRACELLULÁRIS MAKROMOLEKULÁK SZEREPE A KÖZPONTI IDEGRENDSZER FEJLŐDÉSÉBEN**

**Mészár Zoltán**

TÉMAVEZETŐK: DR. MÓDIS LÁSZLÓ, DR. MATESZ KLÁRA

**Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum  
Általános Orvostudományi Kar  
Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet**

**Debrecen, 2008**

## 1. Bevezetés

Az idegsejtek postmitotikus sejtek, azok elhalása kóros folyamatok vagy az öregedésük miatt nem pótlódik természetes módon. Ehhez társul az idegszövet rendkívüli érzékenysége a környezeti hatásokra, így az idegrendszeri sérülés vagy kóros elhalás regenerációját célzó gyógyítási lehetőségek nagyon korlátozottak. Az idegrendszer regenerációjának megértésének kulcsa a normális differenciálódás alapjelenségeinek megismerése. Ebből adódóan az idegrendszer kialakulásának mechanizmusa folyamatosan a kutatások középpontjában áll. Az idegrendszer szerveződésének főbb mozzanatai már régóta ismertek, az emögött húzóó molekuláris mechanizmusokat azonban csak a közelmúlt kutatásainak köszönhetően kezdtük megismerni, köszönhetően a molekuláris biológiai módszerek térhódításának.

Az idegrendszer a neuroektodermából, a dorsalis ektodermának azon részéből fejlődik, amelyik az embrió hossz tengelyével párhuzamosan található és velőlemeznek hívjuk. A folyamat a neuruláció, melynek során a velőlemez elválik a dorsalis ektoderma sejtjeitől önmagával csövet, a velőcsövet alkotva ezzel. A velőcsőben ezután sejtproliferáció, migráció és sejt differenciáció indul meg egy időben zajló folyamatokként. A központi idegrendszerben, így a gerincvelőben is jellemző, hogy a proliferáló sejtek a velőcső lumenéhez közel, míg a lefűződött, differenciálódásnak indult sejtek ettől laterálisan találhatók. A differenciálódó sejtek migrációja elsősorban tehát a lumentől sugárirányban történik, az ún. radiál gliasejtek nyúlványai mentén. Egyes speciális neuron-csoportok esetén a radiális migráció mellett más irányban is történik sejt vándorlás idegmagvakat létrehozva ezzel a központi idegrendszerben. Ezen folyamatok miatt az idegszövet morfológiailag egy magasan szervezett struktúra, melyben minden idegsejtnek megvan a neki megfelelő helye. Ez biztosítja azt, hogy a funkció szempontjából helyes neuronális kapcsolatok létre tudjanak jönni az axonnövekedés során.

Az extracelluláris mátrix (ECM) jelen van minden állati szövetben, így a központi idegrendszerben is megtalálható. Ez a komplex struktúra makromolekulákat tartalmaz, melyek egymással és sejt felszíni receptorokkal kapcsolódhatnak, illetve vizet és ionokat kötnek meg. Az ECM struktúrája változik a fejlődés során. Jóllehet sok *in vitro* kísérleti adattal rendelkezünk az ECM szerepéről az idegrendszer differenciálódásában, *in vivo* ismereteink még eléggé hiányosak. Egyik speciális komponense az ECM-nek a hialuronsav (HA), mely a gerincesekben jelenik meg először a törzsfejlődés során. Nagy molekulatömegű poliszaccharid, melyet a sejt membránban lokalizálódó HA szintáz enzimek (HAS1, 2 és 3) termelnek, és extracellulárisan sejt felszíni receptorokhoz (CD44 és RHAMM) és lektinokhoz (HA kötő kondroitin-szulfát proteoglikánok) kötődhet. Ezen kívül említésre érdemes a HA rendkívül nagy vízmegkötő képessége is. Ismert, hogy a HA olyan létfontosságú folyamatokban játszik szerepet, mint a sejt migráció, génexpresszió regulációja vagy az ECM alkotók összetartása.

Keveset tudunk a HA előfordulásáról és funkciójáról a neuronális fejlődésben. Jóllehet a HA és ahhoz kapcsolódó lektinok bőségesen jelen vannak az idegrendszerben és nagyon sok kutatás

rendkívül fontosnak írta le az idegrendszer kialakulása és plaszticitásának fenntartása során, a pontos szerepe ezen molekuláknak még kevésbé ismert. A lektikánok szerveződésében a HA szerepe kulcsfontosságú, így a HA hatását a sejtproliferációra, sejt migrációra és az axonnövekedésre a neuronális fejlődés során a lektikánokon keresztül közvetve vagy sejt felszíni receptorain keresztül közvetlenül is kifejezheti.

Az idegrendszer fejlődésének *in vivo* vizsgálatát gyakran végzik csirkeembrión, lévén annak könnyű beszerezhetősége és manipulálhatósága miatt. Ennek megfelelően a csirkeembrió idegrendszeréről rendelkezünk a legtöbb adattal. Az ideg regeneráció *in vivo* vizsgálatát ugyancsak gyakran végzik embrióban, de ettől jobb modell egy kifejlett állat, melynek központi idegrendszere képes a regenerációra. Ilyen gerinces állat a béka, melyen jól végezhetőek *in vivo* regenerációs kísérletek.

## 2. Célkitűzések

Az ECM-sejt kapcsolatáról a központi idegrendszerben még viszonylag keveset tudunk. Az idegsejtek körül levő makromolekuláknak szerepe van az idegrendszer kialakulásában és regenerációjában. Munkánkban hangsúlyt helyeztünk a HA, mint egyik fő mátrixalkotó változásának nyomon követésére két különböző kísérleti modellben. Első kísérletsorozatunkban a HA és a HA-val közvetlenül vagy közvetve kapcsolódó proteoglikánok expressziós mintázatát figyeltük meg a gerincvelő embrionális fejlődése során azért, hogy többet tudjunk meg ezen molekulák lehetséges szerepéről a neuronális differenciáció során. Ezzel fontos adatokhoz juthatunk az idegi regeneráció alapmechanizmusainak megértéséhez is. Ehhez kapcsolódóan másik kísérletsorozatunkban az ideg regeneráció során az ECM struktúrájában bekövetkező változásokat követtük nyomon béka állatmodellen.

### *Munkánk során a következő célokat tűztük ki:*

1. A HA eloszlási mintázat megfigyelése fejlődő csirkeembriók gerincvelő telepeiben hisztokémiai reakcióval különböző neuronális és differenciációs markerek mellett.
2. Ugyanezen életkorú csirkeembriók gerincvelő telepeiben a HA szintéziséért felelős hialuronsav-szintáz enzimek expressziójának detektálása biokémiai módszerekkel.
3. A HA kötődő kondroitin-szulfát proteoglikánok és a phosphacan expressziójának nyomon követése a hialuronsav változásának függvényében az embrionális gerincvelőben immunohisztokémiai és biokémiai módszerek segítségével.
4. *In vivo* kísérleti modellben a HA eloszlás változásának nyomon követése a vestibularis ideg átvágását követő regeneráció során békában hisztokémiai vizsgálatokkal kombinált optikai denzitometriai mérések segítségével.

### 3. Anyagok és módszerek

#### **3.1. Állatkísérletek, állatkísérletekhez szükséges engedélyek**

##### *3.1.1. Csirkeembrió in vivo modell*

A gerincvelő fejlődése során változó sejtközötti állomány tanulmányozását csirkeembriókon végeztük. A csirkeembriót gyakorta használják fejlődéstani kutatásokra, különösen a fejlődő idegrendszer vizsgálatára alkalmas. Ennek oka részben annak könnyű beszerezhetősége, illetve az, hogy jól ismerjük az embrió fejlődése során bekövetkező főbb változásokat, mivel a fürj embrióval kimérákat lehet vele létrehozni. Ezzel a módszerrel már a molekuláris biológiai technikák (pl.: knock in és out) széles körű elterjedése előtt felderítették a csirkeembrió őssejtjei sorstérképének alakulását. A hisztokémiai és biokémiai vizsgálatokhoz különböző fejlettségi stádiumban levő csirkeembriókat gyűjtöttünk, melyeket a Hamburger és Hamilton (HH) által közölt tanulmányuk szerint határoztunk meg. Az általunk gyűjtött legfiatalabb embrió HH8 volt, amely a keltetés 20. órájában tart és jellemző rá a velőlemez velőcsővé való záródása előtti állapot. A legidősebb gyűjtött embrió a keltetés 8. napjára jellemző HH39 stádium volt.

##### *3.1.2. Béka in vivo modell*

Az idegrendszer regenerációjának nyomon követését a sejtközötti állomány változásának függvényében kecskebékán (*Rana esculenta*) végeztük. A kísérleti modellben a nervus vestibulocochlearis ideg primer afferensei által beidegzett agytörzsi vestibularis magokban vizsgáltuk az extracelluláris mátrix összetételeének és struktúrájának változását annak regenerációja során. A békát ezekben a kísérletekben optimális választásnak gondoljuk, mivel egyrészt jól ismerjük a vestibuláris ideg főbb kapcsolatait, másrészt korábbi vizsgálataink során laboratóriumunkban már elkészítettük az egészséges béka központi idegrendszerének hialuronsav térképét, amely az idegrendszeri ECM egyik fő alkotója. További előnye a békának, hogy a központi idegrendszer is képes a regenerációra. A vestibulocochlearis ideg sérülését követő funkció kiesés, majd a regenerációt követően a funkció visszaállítása is könnyedén regisztrálható a béka testtartásán. A béka, mint modellállat hátrányaként megemlíthető annak körülményesebb beszerzése, illetve a tény, hogy a kételtűekben kapott eredmények közvetlenül nem extrapolálhatók emlős, elsősorban humán szövetekre. A kapott kísérleti adatok azonban jelentős információval járulhatnak hozzá az idegrendszer regeneráció alapmechanizmusának megértéséhez.

A békákat a nervus vestibulocochlearis sérülését célzó átvágásához az állatokat altattuk MS222 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) bőrön át való alkalmazásával. A nervus vestibulocochlearist feltártuk, majd az agytörzsbe való belépéstől kb 1 mm-re distalisan, de a ganglion vestibularetol medialisan átvágtuk. Az átvágott idegvégeket egymáshoz illesztettük, majd a műtétet követően a

vágott nyálkahártya egyesítését sebragasztóval végeztük. A műtétet követően az állatokat 11 °C-on tartottuk, majd a műtétet követő 3-84 napokon (9 periódusban) hisztokémiai módszer segítségével vizsgáltuk a HA változásán keresztül az ECM struktúrájának változását a vestibularis magok idegsejtjei körül és az ideg ún. belépési zónájában. A kísérletsorozathoz összesen 96 állatot használtunk, melyből 64-nek (ebből 39 élt túl) vágtuk át az egyik (rend szerint a jobb) oldali nervus vestibulocochlearisát. Ezekből 45-öt (27 túlélőt) hisztokémiai vizsgálatokra készítettünk elő, míg 19-et (12 túlélőt) nervus vestibulocochlearis regenerációjának vizsgálatára neurobiotinnal való feltöltés segítségével. 27 állaton áloperációt végeztünk, míg 5 állatot nem operáltunk.

Az állatkísérletek végzéséhez szükséges Debreceni Egyetem Munkahely Állatkísérleti Bizottsága által kiadott engedéllyel rendelkezünk, melynek száma: 22/2001 DE MÁB.

### **3.2. Hisztokémiai vizsgálatok**

#### *3.2.1. Preparátumok készítése*

##### *3.2.1.1. Csirkeembrió *in vivo* modell*

A hisztokémiai vizsgálatokat paraffinba ágyazott 5 µm vastag szövettani metszeteken végeztük. A különböző fejlettségű csirkeembriókat tojásból való izolációjuk után fiziológias sóoldatban mostuk, majd jéghideg Sainte-Marie fixálószerben egy éjszakán át fixáltuk 4 °C-on. Ezen alkohol tartalmú fixáló alkalmazásával meg tudtuk őrizni a szövetekben a vizes fixálókkal könnyen kimosható hialuronsavat és más ECM alkotókat. Fixálás után az embriókat 70%-os etanolban mostuk, majd felszálló alkoholsorral történő vízelvonást követően paraffinba ágyaztuk és keresztmetszeteket készítettünk az alsó thoracalis illetve a felső lumbalis gerincvelői szakaszokon.

##### *3.2.1.2. Béka *in vivo* modell*

A béka vestibularis ideg átvágása és azt követő regenerációs idő után az állatokat MS222 segítségével túlaltattuk, majd az agytörzsüket izoláltuk és fiziológias sóoldatban megfosztottuk agyburkaitól. Az így elkészült preparátumokat Sainte-Marie fixálóval fixáltuk az embriókhoz hasonló módon, majd dehidrálasukat követően paraffinba ágyaztuk azokat. A hialuronsav változását horizontális síkban készült agytörzsi sorozat-keresztmetszeteken követtük nyomon, melyek metszési síkjába estek a vestibularis magok.

#### *4.2.2. A hialuronsav kimutatása*

A hialuronsavat egy arra specifikus hisztokémiai reakcióval mutattuk ki szövettani metszetekben. A felhasznált specifikus próbánkat a finnországi Kuopioi Egyetem Anatómia Intézetéből kaptuk (Raija Tammi és Markku Tammi professzoroktól). A biotinnal jelzett próba a hialuronsav polyszacharid 10 diszacharid egységből álló oligoszacharidjához kötődik specifikusan, amely a szarvasmarha aggregán proteoglikán molekula központi fehérjének hialuronsav kötő, ún. G1 doménjéből származik. A paraffinba ágyazott metszeteken, rehidrálasuk után PBS-ben hígított 5 µg/ml próbát egy éjszakán át 4

°C-on inkubáltunk. Az inkubációt követő mosások után peroxidázzal konjugált Extravidint (1:1000, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) alkalmaztunk, majd DAB peroxidáz enzim szubsztrát assayt (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) használtunk a bekötődött biotinilált próba láthatóvá tételéhez. A HA fluoreszcens mikroszkópiás vizsgálatához a bekötődött próbát Alexa 488 vagy Alexa 555 konjugált streptavidint (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) használtunk.

#### *4.2.3. Immunohisztokémiai reakciók*

##### 4.2.3.1. Proliferáló és differenciálódó sejtek kimutatása

A proliferáló sejteket PCNA elleni monoklonális antitesttel detektáltuk (1:500, Chemicon, Temecula, CA, USA). A PCNA fehérje az S fázisban levő sejtek magjában expresszálódik, ahol DNS-hez kötődve a végrehajtó egység faktoraként funkcionál a delta DNS polimeráz működése során.

A sejt differenciáció különböző fázisaiban levő embrionális gerincvelői sejteket azok homeobox gének expressziójára specifikus antitestek segítségével mutattuk ki. A postmitotikus neuronok Lim1 és 2 homeodomén expressziót mutatnak, melyek kimutatására Lim1,2 monoklonális antitestet használtunk (1:100, DSHB, Iowa City, IA, USA).

Az MNR2 fehérjét a csirkében korai szomatikus motoneuron prekursor sejtekben találjuk. Kimutatásukra monoklonális antitestet használtunk (1:50, DSHB, Iowa City, IA, USA).

A paraffinba ágyazott csirkeembrióból készült metszeteket rehidráció után a PBS-ben hígított elsődleges antitesttel inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C-on. Ezt követően háromszor váltott PBS-sel mostuk 10-10 percre szobahőmérsékleten. Fluoreszcens mikroszkópos vizsgálat esetén egér elleni másodlagos antitestet használtunk (1:500), mely Alexa 488 fluorokrómmal volt konjugálva (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), kombinálva fluoreszcens bHABC hisztokémiai és kondroitin-szulfát immunohisztokémiai reakcióval. A metszeteket majd mosást követően DAPI magfestőt tartalmazó száradó Vectashield fedő médiummal és fedőlemezzel fedtünk (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

##### 4.2.3.2. Intermediér filamentumok megjelölése

Az egyes neuronok illetve gliasejtek és prekursoraik citoplazmájának megfestésére a citoszkeleton alkotó tubulin ellenes monoklonális antitestet (1:100 Chemicon, Temecula, CA, USA) használtunk. Az immunreakciót az előzőekben leírt séma szerint fluoreszcens másodlagos antitesttel tettünk láthatóvá, melyet kombináltunk hialuronsav hisztokémiai és kondroitin-szulfát immunohisztokémiai reakcióval.

A idegsejt axonok kimutatására neurofilament ellenes antitesteket használtunk. A HH23 stádiumig a 68 kDa (1:200, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), míg a későbbi embrió idegeiben a 200 kDa (1:200, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) tömegű neurofilament volt kimutatható. Az immunohisztokémiai reakció kivitelezése a fentebb vázolt séma szerint történt.



#### 4.2.3.3. Kondroitin-szulfát és phosphacan kimutatása

A hialuronsavat kötő lektikánok mindegyike a kondroitin-szulfát oldallánccal rendelkezik, melyek kimutatását a csirkeembrió szövettani metszeteiben kondroitin-szulfát elleni monoklonális antitesttel (1:500, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) mutattuk ki. A phosphacan kimutatásához annak központi tengelyfehérjéje elleni monoklonális antitestet használtunk (1:100, Chemicon, Temecula, CA, USA). A metszeteket az elsődleges antitesttel 4 °C-on inkubáltuk egy éjszakán át, majd PBS-sel történő mosást követően Alexa-488 vagy Alexa-568 konjugált egér IgM elleni második antitestet használtunk (1:1000, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA).

### *3.3. mRNS szintű vizsgálatok*

#### 4.3.1.1. RNS izolálása gerincvelő izolátumokból

Különböző fejlettségi stádiumú (HH16, HH23, HH28, HH34 és HH39) csirkeembriókból ProtectRNA-vel (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) kezelt PBS oldatban gerincvelő szakaszokat izoláltunk. A teljes RNS izolálását kb. 10-15 mg szövetmintából Qiagen Micro Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) segítségével végeztük a gyártó cég által javasolt eljárás szerint.

#### 4.3.1.2. RT-PCR

A lektikánokat és a HAS expresszióját RT-PCR segítségével detektáltuk a csirkeembrió gerincvelő izolátumaiból tisztított RNS-ből. A tisztított RNS-ből 2 ug mennyiséget használtunk cDNS szintézishez, amelyhez Qiagen Omniscript (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) reverz traszkriptáz kitet használtunk fel a gyártó által javasolt protokoll szerint. A PCR reakcióhoz 0,2 ug cDNS-t használtunk fel. Az amplifikációt GoTaq polimeráz enzimmel végeztük (Promega, Mannheim, Germany). A 35 ciklus a következő lépéseket tartalmazta: 94 °C 50 sec, 52-63 °C 1 min, 72 °C 1 min 30 sec. Az amplifikált fragmenteket 1,5% agaróz gélelektroforézissel választottuk el, majd akridin-narancssal festettük. A felhasznált génspecifikus primerek tervezését Primer3 szoftverrel végeztük az NCBI szekvencia adatbázisból letöltött templatok alapján. A primerek szekvenciája a következők voltak: Has2 (330) for 5'-GAGACGACAGGCATCTAACTAAC-3', rev 5'-AAGACTTTATCAGGCCCACTAA-3'; HAS3 (192) for 5'-CCAACAGACCCGCTGGAGCA-3', rev 5'-ACCGTCAACAGGAAGAGGAGGATG-3'; Aggrekán (304) for 5'-TGTTACATCGACAGGCTAAAGGG-3', rev 5'-AAGCGTGATGCCGTGACAGA-3'; Brevikán (405) for 5'-GTGCCTCCTTGCCAGTCTCCAG-3', rev 5'-GGTCCACCACGCCGTAGTTCCT-3'; Neurokán (269) for 5'-GGCGCTCGCTATGCACTGACCTT-3', rev 5'-TCCCGTGCGTAGCAGTAGACATCGTA-3'; GAPDH (366) for 5'-CTGCCAGAACATCATCCA-3', rev 5'-CACGGTTGCTGTATCCAACTCAT-3'.

### **3.4. Optikai denzitometriai mérések**

#### *3.4.1. Csirkeembrió in vivo modell*

A HH23 stádiumban a HA rétegzettség kialakulását optikai denzitometriai mérések segítségével is vizsgáltuk. Ezeket a metszeteken bHABC hisztokémiai reakciót végeztünk, melyet DAB-reakcióval

tettünk láthatóvá. A digitális képeket transzmissziós fénymikroszkóphoz (Olympus AX 70, Japan) kapcsolt hűtéssel rendelkező CCD kamerával (Olympus DP 70, Japan) készítettük, monokróm megvilágítás mellett ( $\lambda=492\pm 5$  nm). A rendszer kalibrációja után a HA reakció intenzitását mértük, amely arányosan változik a HA viszonylagos koncentrációjával, amelynek alkalmazásáról kutatócsoportunk már korábban beszámolt. A mért területet (region of interest, ROI) Image J szoftver (NIH, Bethesda, MD, USA) segítségével jelöltük ki. A mérésekhez 10 párhuzamos metszetet vettünk, melyeken 5-5 egymástól független ROI-t (területe  $250 \mu\text{m}^2$ ) jelöltünk ki a gerincvelő három különböző helyén: a ventrikuláris zónában, az intermedier zónában és a köpenyzónában. A háttér – ami a bHABC negatív kontroll reakcióját jelenti – kivonása után a mikroszkóp és a kamera beállítását nem változtattuk meg a digitális felvételek elkészítése során, melyekből a ROI integrált, DAB reakció által fedett intenzitás átlagértékeit mértük (ez adta a „grey level” értéket). Ezekből az értékekből optikai denzitás értékeket számoltunk.

A bHABC reakció által fedett területeket a sejt denzitás értékeivel korrigáltuk. A sejt denzitást a gerincvelőben párhuzamos metszeten hematoxylinnal festett preparátumokon mértük, melyeket a sejtek citoplazmájának szegmentálása után kalkuláltunk. A méréseket és a szegmentálást Adobe Photoshop (Verzió: 8.0, Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) szoftver segítségével végeztük. Ezen kapott számadatokat végül Ms Excel (Microsoft Corp. Redmond, WA, USA) segítségével kivontuk a összes ROI-ból, megkapva így a sejtek által nem foglalt terület százalékos nagyságát. A lumbalis gerincvelő három területén mért bHABC reakció optikai denzitás értékeit végül korrigáltuk az extarcellularis tér százalékos nagyságával.

#### *3.4.2. Béka in vivo modell*

A HA változásának nyomon követését a béka vestibulocochlearis ideg regenerációja során is hasonló optikai denzitometriai mérések segítségével végeztük el. Minden esetben állatonként 2-5 digitális képet készítettünk a VIII. agyideget tartalmazó agytörzsi keresztmetszetekből, külön az operált és a nem operált oldalról, melyhez Nikon Eclipse 800 (Japan) mikroszkóphoz szerelt hűtött Spot RT Slider (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) digitális kamerát használtunk. A méréshez a primer afferensek átmeneti zónájából (transitionalis zona, TZ), a nucleus vestibularis medialisból (NVM) és a laterálisból (NVL) választottunk ki területeket ( $\text{ROI}=400 \mu\text{m}^2$ ), mely magok határai korábbi leírásokból már ismertek.

### **3.5. Statisztikai módszerek**

A gerincvelő három régiójában mért optikai denzitás és a sejtdenzitás adatok összehasonlítását Mann-Whitney -féle U-tesztel végeztük PAST statisztikai szoftver segítségével.

A béka VIII. agyideg regenerációját vizsgáló kísérleteinkben – mivel adataink csak kis eltéréseket mutattak – először ellenőriztük, hogy van-e szignifikáns különbség az agytörzs egy adott magjának HA reakció intenzitásában, ha egy állat ugyanazon idegmag különböző helyén mérünk, vagy más

állatból származó mintákon végzünk méréseket. Ehhez a vizsgálathoz a tractus solitarius HA reakciójának intenzitását mértük meg. Ez a képlet egyfelől könnyen beazonosítható a metszeteken és homogén struktúra, másrészt pedig ez a terület rendelkezik a leggyengébb HA intenzitással. Az intenzitásértékeket kéttényezős variancia analízissel (ANOVA) elemeztük és nem találtunk szignifikáns különbséget sem az azonos ( $P > 0,29$ ), sem pedig a különböző ( $P > 0,34$ ) állatokból származó metszetek között. Így a későbbiek során a vestibularis magok és a primer afferensek belépési zónájának vizsgálatakor nem tettünk különbséget sem az egy állatból származó, sem pedig a különböző állatokból származó identikus struktúrákat viselő metszetek között.

A bHABC hisztokémiai reakció intenzitását az operációt követő egyes napokon kétmintás t-próbával hasonlítottuk össze, miután vizsgálataink szerint az adatok normáleloszlást követtek. Az adatok normál eloszlását két kritérium szerint teszteltük: (1)  $0,9 < \text{medián}/\text{átlag} < 1,1$  és (2)  $3 \times \text{standard deviació} < \text{átlag}$ . A varianciák egyenlőségét F-próba segítségével ellenőriztük. Az intenzitás változások tendenciáját lineáris regressziós egyenesek meredekségének mérésével vizsgáltuk, míg az ép és operált oldalak közötti HA intenzitásbeli változások lehetséges összefüggéseit Fischer féle megfelelési próbával vizsgáltuk. A statisztikai vizsgálatokhoz MS Excel (Microsoft Corp. Redmond, WA, USA) és GraphPad Prism (Verzió: 4.00 GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) szoftvereket használtuk.

## **4. Eredmények és megbeszélésük**

### **4.1. A hialuronsav vizsgálata a fejlődés során**

#### ***4.1.1. A bHABC hisztokémiai reakciók specifikusságának vizsgálata, kontroll kísérletek***

A hisztokémiai reakciók specifikusságát mind csirkeembriókon, mind pedig a békán megvizsgáltuk. Csirkékben, mivel teljes embrió keresztmetszeteket készítettünk, az idősebb (HH34) korú egyedek csigolyatestének porcosodó telepén mutattunk ki HA-t. Békákon a sternum porcos részén végeztünk bHABC hisztokémiai reakciót, amely jelölést mutatott a territorialis és az interterritorialis mátrixban. A hisztokémiai reakció negatív kontrolljaként három párhuzamos kísérletet végeztünk el: 1., bHABC nélkül, a hívórendszer kontrolljaként, 2., bHABC próbával, de a metszetből *Streptomyces* hialuronidáz emésztéssel eltávolítottuk a HA-t, 3., bHAPC próbával, melynek oldatához hialuronsavat adtunk. Ezen reakciók elvégzése után egy esetben sem kaptunk jelet.

#### ***4.1.2. Hialuronsav akkumuláció a gerincvelő különböző fejlődési szakaszaiban***

A hialuronsav már egészen korán, a HH8 stádiumú embrióban a velőlemezben kimutatható és csaknem az egész fejlődés során megtalálható. Tapasztalataink szerint a HA reakció által lefedett területek nagyságát nézve két egymástól jól szétválasztható szakasz (csúcs) ismerhető fel. Az egyik a gerincvelő fejlődésének nagyon korai stádiuma, amely a HH23 (4. embrionális nap) stádiumban, a másik az embrionális gerincvelő fejlődésének késői szakasza, ahol az általunk vizsgált legkésőbbi, a HH39 stádiumban éri el a HA reakció lefedettségének maximumát. A két HA expressziós csúcs között találjuk meg az embrionális fejlődésnek azt a stádiumát (HH34), ahol bHABC hisztokémiai módszerrel nem mutatható ki HA a gerincvelőben. A HA szintézis szempontjából a gerincvelő fejlődésének a HA eloszlás maximumát adó két stádium mutatkozott a legérdekesebbnek. RT-PCR segítségével kimutattuk, hogy HA akkumulációért ezekben a stádiumokban mind a HAS2, mind pedig a HAS3 felelős.

#### ***4.1.3. A hialuronsav réteges eloszlási mintázata HH23 stádiumú gerincvelőben***

Ahogy arról az előzőekben is szó volt, a HA eloszlási mintázata lényeges változást mutat a HH23 stádiumban az előző életkorokhoz képest. Egy diffúzan jelenlevő HA-reakció jól látható réteges elrendeződési mintázattá alakul a HH23 stádium elérésekor. Medio-laterális irányban három különböző HA pozitív réteget tudunk elkülöníteni: 1) gyengén jelölődő ventrikuláris zóna, 2) erősen jelölődő intermedier zóna, 3) közepesen jelölődő köpenyzóna. Mivel a HA döntő részben az extracelluláris térben mutatható ki, ezért megvizsgáltuk, hogy ez a jellegzetes HA eloszlási mintázat kialakulása összefüggésbe hozható-e a sejtdenzitás mediolaterális irányban történő változásával. Ezekben a zónákban tett megfigyeléseinket optikai denzitometriai mérések segítségével is igazoltuk. A

sejtek denzitása a medialisán levő ventrikuláris zónában a legnagyobb, így egyben itt a legkisebb az extracelluláris tér nagysága is. Annak eldöntésére, hogy az intermedier zónában látszólag nagyobb mennyiségben jelen levő HA az extracelluláris tér növekedése miatt vagy az ott levő sejtek akkumulációja miatt van-e, sejtdenzitással korrigált HA optikai denzitást mértünk. A mérési adatok alapján elmondhatjuk, hogy a hialuronsav nem elsősorban az extracelluláris tér növekedése miatt több, hanem sokkal valószínűbb, hogy azt az intermedier zónában levő sejtek termelik nagyobb mennyiségben.

#### ***4.1.4. A hialuronsav akkumulációja differenciálódó neuronok körül***

Vizsgáltuk, hogy a HH23 stádiumú csirkeembrió gerincvelő intermedier zónájában mely sejtek körül lehet látni a megnövekedett hialuronsav akkumulációt. Ehhez fluoreszcens kettős jelöléseket végeztünk, melyben fluoreszcens bHABC hisztokémiát kombináltuk immunofluoreszcens jelöléssel. A proliferáló PCNA pozitív sejtek a ventrikuláris zónától terjednek az intermedier zónáig, éppen addig a területig, ahol a hialuronsavban gazdag régió található. Ezen sejtek rétegétől laterálisan Lim1,2 immunopozitív sejtek rétege van, mely a differenciálódó postmitotikus neuronokra jellemző. A gerincvelő ventralis oldalán levő motoneuron prekursor sejtek legkorábban az MNR2 homeodomén expressziójukról ismerhetők fel. Ezen sejtek lokalizációja teljesen egybeesik a HA-ban gazdag intermedier zónával. A HA réteg tehát elválasztja egymástól a differenciálódó sejteket a proliferáló sejtpopulációtól. Az egyelőre kérdés, hogy az intermedier zónában mért nagy HA mennyiség a sejtciklus S fázisában levő proliferáló sejtek terméke vagy a már lefűződött differenciálódó (Lim1, 2 és MNR2 pozitív) sejteké. Az is kérdéses, hogy itt a HA a proliferáló sejtekben a proliferációt, a differenciációt vagy a laterális migrációt segíti-e. Rendelkezünk néhány irodalmi adattal a HA jelenlétéről a fejlődő idegrendszerben. Ezek szerint feltételezhető, hogy a HA a neuronok differenciálódáshoz szükséges faktor, ennek pontos mechanizmusa azonban nem ismert. Valószínűnek látszik az, hogy a HA egy erősen hidratált környezetet hoz létre a sejtek körül elősegítve ezzel migrációjukat. Ezt az elméletet alátámasztani látszik az az irodalmi adat, amelyben az egér fejlődő cerebellumában a HA jelenlétét írták le migráló neuronok útvonalán. Több, nem neuronális sejtípusban leírták, hogy a migrációs folyamatokban a HA CD44 és RHAMM receptorain keresztül közvetített jelátvitel során kis GTPáz enzimeket aktivál, melyek a citoskeleton újraszerveződését eredményezik, és ez lamellipodium kialakulásához vezet. A csirkeembrió gerincvelőben a HA-ban gazdag intermedier zónában nem találtunk sem CD44 sem pedig RHAMM immunopozitivitást, így továbbra is kérdéses, hogy a HA önállóan vagy mely más molekulák segítségével fejti ki hatását a differenciálódó neuronokra. A differenciált idegrendszerre jellemző, hogy a neuronok felelősek a HA termeléséért. Annak ismeretében, hogy a HAS enzimek a HA sejt felszíni kötőfehérjéi is egyben, így a HAS2 és HAS3 autokrin módon való hatását feltételezzük a fejlődő idegrendszerben.

#### ***4.1.5. hialuronsav különböző megoszlási profilja az axonok körül a központi és perifériás idegrendszerben***

Az axonokat neurofilament tartalmuk alapján immunofluoreszcens módon jelöltük a fehérállomány korai (HH23) és későbbi (HH29) fejlődési szakaszában, melyet kombináltunk fluoreszcens bHABC hisztokémiai reakcióval. Az idegsejtek axonjai körül a HA pozitivitás is különbségeket mutat mind a fejlődés során, mind pedig azonos fejlődési stádium eltérő helyein. A perifériás idegekben és azok be- és kilépési zónáiban sem tudtunk HA-t kimutatni egyik vizsgált fejlődési stádiumban sem, jóllehet a perikaryon körül pozitív volt a reakció. Ez a HAS polarizált expresszióját feltételezi az egyes neuronokban, mivel ezekben a stádiumokban nem valószínű a differenciált oligodendroglia jelenléte, amelyek a HA-t akumulálhatnak az idegsejtek köré, mivel azok később jelennek meg. A fehérállomány közül a funiculus laterálisban mutat erőteljes HA pozitivitást, melyek eredő sejtjei is HA-ban gazdag szürkeállományban találhatók. A funiculus laterálisban talált erős HA pozitivitás időben egybeesik a tractus reticulospinalis és tractus spinocerebellaris le és felszálló pályák kialakulásával a csirkében, így ezeket a pályákat kialakító axonok növekedésben feltételezhetően permisszív szerepet játszik a HA. A motoneuronok az életkor előrehaladtával egyre intenzívebb hialuronsav mátrixban voltak megfigyelhetők. A HH39 stádiumban a motoneuronok, azok proximális dendritjeivel együtt már teljesen körbevettek a hialuronsavban gazdag ECM által. A synaptogenesis kritikus periódusának vége egybeesik a HA és az azokhoz kötött lektikánok felhalmozódásával a neuronok körül, vagyis a formálódó perineuronális háló kialakulásával. A perineuronális háló kialakulását általában a postnatalis életkorokra teszik. Ezen tanulmányok azonban olyan agyterületeket vizsgálnak, melyek a postnatalis élet során fognak funkcionálni. A csirkeembrió gerincvelőben ezzel szemben már az embrionális élet végén a HH39 stádiumban igen fejlett perineuronális hálót találunk. Ez a látszólagos ellentmondás feloldható azzal a ténnyel, hogy a csirke a kikelés pillanatában már képes a lépőmozgásokra. Így nagyon valószínű az, hogy a synaptogenesis kritikus periódusa a gerincvelőben az embrionális életre tehető.

#### **4.2. A kondroitin-szulfát proteoglikánok vizsgálata a fejlődő gerincvelőben**

##### ***4.2.1. Kondroitin-szulfát eloszlása az életkor függvényében***

A kondroitin-szulfátok a (CS) proteoglikánok (PG) központi fehérjéihez kapcsolódva fordulnak elő. Az idegrendszerben jelenlevő CSPG-k egyik csoportja a HA-hoz kötődő lektikánok, a másik csoport a nem HA-hoz kötődő PG-k. Ez utóbbi csoportba tartozik a phosphacan. A CS elleni monoklonális antitesttel ezek együttes előfordulását vizsgáltuk a csirkeembrió fejlődő gerincvelőben. Minden stádiumban nagymértékben átfed a CS immunopozitivitás a HA-val. Ez várakozásainknak megfelelően lektikánok expresszióját feltételezi. RT-PCR segítségével az aggregánt, a neurokánt és a brevikánt

tudtuk kimutatni a gerincvelőből származó mintákból. Ezek életkor szerinti megoszlása azonban változó. A neurokán folyamatos expressziója jellemző a vizsgált stádiumokban, míg a brevikán és az aggregán csak a HH23 stádiumtól lesz jellemző. A lektikánok N-terminalis G1 doménjükkel a HA-hoz, míg C-terminalis végükkel más mátrix fehérjékhez (főleg tenascinhoz) vagy sejtfelszíni fehérjékhez kötődik. A molekula középső része CS-t köt változó mennyiségben. Ezek a CS oldalláncok okozzák a PG-k polyanionos karakterét, mely fontos szerepet tölthet be a sejtek körüli megfelelő ionkoncentráció fenntartásában. A lektikánok CS tartalma tág határok között változik, így a sejtek nemcsak egy adott PG expressziójának fokozásával vagy csökkentésével tudják regulálni a maguk vagy a szomszédos sejtek köré akkumulált CS mennyiségét, hanem a központi tengelyfehérje változtatásával is. Ennek megfelelően a neurokán és a brevikán expresszióval viszonylagosan kevesebb CS oldalláncuk miatt kevésbé anionosak, míg a versikán és főleg az aggregán erősebb anionos karakterrel bírnak. A lektikánoknak a fejlődő idegrendszerben sejtmigrációt gátló hatását írták le, ezek a tanulmányok azonban a crista neuralis sejtek migrációját gátló hatásáról emlékeznek meg és nem a központi idegrendszerben található sejtekről. Az osztódó sejtek körül található PG-ok szerepe nem teljesen tisztázott. Ha azonban a CS hasonló hatását feltételezzük a neuroblasztokra és a glioblasztokra, mint a crista neuralis sejtekre, úgy valószínűsíthető, hogy a CS az osztódó sejtek izolációjáért lehet felelős, ahogyan azt a HH23 stádiumú gerincvelő intermedier zónájában találtuk. Ezen kívül a canalis centralishoz közel eső sejtek basalis felszínén találtunk erős CS reakciót, mely valószínűleg a lefűződött leánysejtek canalis centralis felé történő migrációját akadályozhatja meg. A CSPG-k a sejtmigráció akadályozása mellett a neuroprogenitor sejtek osztódóképességét is csökkentik. Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy e gátló hatásukat a CS oldalláncok biztosítják, mivel a CS szelektív emésztése kondroitináz-ABC kezeléssel felfüggeszthető ez a proliferációt gátló hatás. A CS GAG-ok hatásukat valószínűleg nem közvetlenül fejtik ki, hanem növekedési faktorok, mint potenciális ligandumaik szabályozása útján. Ilyen potenciális ligandum lehet a CS oldalláncoknak a HB-GAM/PTN (heparin binding growth association molecule/pleitrophin), melynek a neurokán CS oldalláncaival történő kölcsönhatását igazolták.

#### ***4.2.2. A phosphacan expressziós mintázata a csirkeembrió gerincvelőben***

A phosphacan a nem HA kötő CSPG-k csoportjában tartozik, és mai ismereteink szerint kizárólag az idegrendszerben expresszálódik. Csirkespecifikus monoklonális antitesttel vizsgáltuk a phosphacan fejlődés-függő expresszióját a gerincvelőben feltételezett szerepének felderítése érdekében. A phosphacan expresszióját legkorábban a HH23 stádiumban tudtuk kimutatni a perifériás idegekben, a tetőlemez sejtjei körül, a szárnylemez intermedier zónájában és a radier glia sejtek körül. A fehérállományban és a belépési zónában is immunopozitivitást detektáltunk, míg a commissura anterior negatívnak bizonyult. Az ezt követő stádiumokban folyamatosan növekszik a phosphacan immunopozitív területek aránya a gerincvelőben. A HH28 stádiumban feltűnő a belépési zóna erős

jelölődése, míg a tetőlemezben alig mutatható ki. A HH35 stádiumban kontrasztos különbség érzékelhető a dorsalis és a ventralis gerincvelőfél phosphacan reakciójában, mely szerint a hátsó szarvban és a funiculus dorsalisban sokkal gyengébb reakció látható. Némileg erősebb a jelölődés a canalis centralis körüli sejtekben, a X. laminában. Az expresszió még fokozottabb a HH39 stádiumban, ahol gyakorlatilag minden sejt körül megtalálható. A hátsó szarvban látszólag gyengébb jelet tudunk detektálni, mely valószínűleg összefüggésben állhat a neuronok érése során kialakuló perineuronális hálóval, ami a neuronokon létrejött synaptikus kapcsolatok stabilizálását segíti, míg az új synapsisok létrejöttét gátolja. Ebben a stádiumban a perifériás idegek is phosphacant tartalmaznak, de a reakció jóval erősebb a belépési zónában. A phosphacan a gerincvelőben a proliferáló sejtek körül akkumulálódik, így feltételezzük a sejtosztódást segítő hatását, melyet az irodalmi adatok alapján FGF2 mitogén aktivitásának fokozásával érhet el.

#### **4.3. A nervus vestibulocochlearis sérülésének hatása a hialuronsav eloszlásra békákban**

A VIII. agyideg postganglionális lézióját követően a HA expresszióban bekövetkezett változásokat követtük nyomon a primer afferensek belépési zónájában és az azokat fogadó nucleus vestibularis medialisban (NVM) és lateralisban (NVL) békákban. A HA-t az agytörzsi keresztmetszetekben bHABC hisztokémiai reakció segítségével mutattuk ki. A metszetekről készített digitális felvételeken a reakció intenzitását optikai denzitometriai mérésekkel követtük nyomon. Az operációt követő első napokon az NVM-ben és az NVL-ben az idegsejteket körbevevő HA-ban gazdag perineuronális háló nem volt elkülöníthető a neuropiltól. Ez a jelenség főként az operált oldalon volt tapasztalható. A perineuronális háló újraszerveződését az operációt követő 14. naptól kezdődően detektáltuk. Ezzel szemben a belépési zónában a HA optikai denzitása nem követte ezeket a változásokat. A statisztikai analízis azt mutatta, hogy a mért változások az operáció miatt következtek be mindkét oldalon. Eredményeink elsőként mutatják be, hogy (1) a HA optikai denzitása változik a nervus vestibulocochlearis léziója miatt a primer afferens belépési zónájában, illetve a NVM és NVL-ben, (2) ezekben a struktúrákban HA optikai denzitásának változása eltérő tendenciát mutat és (3) ezek a változások hasonlóan jelentkeznek a nem operált oldalon is. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a HA-nak szerepe lehet a vestibularis ideg regenerációjában és funkcióinak helyreállításában.



## 5. Összefoglalás

Az extracelluláris mátrix (ECM) egyik fő komponense a hialuronsav (HA), mely fontos szerepet játszik a mátrixalkotók organizációjában és a sejt-ECM kapcsolat regulációjában.

Munkánk első részében a HA és a HA-hoz kötődő kondroitin-szulfát proteoglikánok (CSPG) expressziós mintázatát térképeztük fel csirembriók gerincvelő telepeiben, annak érdekében, hogy újabb adatokat gyűjtsünk ezen ECM alkotók lehetséges szerepéről a neuronok differenciációja és axonjaik növekedése során. A HA specifikus hisztokémiai reakciót kombinálva különböző neuron populációkat jelző immunofluoreszcens jelöléssel szövettani metszetekben kimutattuk, hogy a HA elsősorban a postmitotikus állapot előtti osztódó sejtek körül akkumulálódik. A HA valószínűleg non-permisszív a sejtproliferációra, és a neuronok kezdeti differenciációját segíti. Kimutattuk, hogy a HA akkumulációért a hialuronsav-szintáz (HAS) 2 és HAS 3 a felelős, melyek valószínűleg egyben az egyetlen HA kötő sejtfelszíni molekulák is ezekben a sejtekben. A HA kötő CSPG-k (lektikánok) eloszlását vizsgáltuk RT-PCR és hisztotechnikai módszerek segítségével ugyanezen csirkeembriók gerincvelő telepeiben. A lektikánok expressziós mintázata nagy átfedést mutatott a HA reakcióval, így feltételezhetően funkcionális kapcsolat van ezen molekulák között. A lektikánok közül a neurokán expressziója volt jellemző a fiatalabb stádiumokban, míg idősebb korban az erősen glikozilált aggregán expressziója dominált. A phosphacan (nem HA kötő CSPG) expresszióját is kimutattuk az embrionális gerincvelőben a proliferáló sejtek körül, a perifériás idegekben és azok belépési zónájában valamint a fehérállományban.

Munkánk második részében a HA változását figyeltük meg a nervus vestibulocochlearis átvágását követő regenerációban békákon. A regeneráció idején a HA jelentősen csökkent a primer afferenseket fogadó vestibularis magokban, amely a HA eloszlás struktúrájában is megmutatkozott; az idegsejtek körüli perineuronális hálóban levő HA jelölődés lecsökkent. Ennek alapján a HA non-permisszív hatását feltételezhetjük a központi idegrendszerben, míg a periférás idegekben permisszív hatással bírhat.

## 6. Saját közlemények jegyzéke

### Az értekezést megalapozó in extenso közlemények:

**Meszar Z**, Felszeghy S, Veress G, Matesz K, Szekely G, and Modis L. 2008. Hyaluronan accumulates around differentiating neurons in spinal cord of chicken embryos. Brain Res Bull 75:414-418. **IF: 1,684**

Halasi G, Wolf E, Bacskai T, Szekely G, Modis L, Szigeti ZM, **Meszar Z**, Felszeghy S, and Matesz C. 2007. The effect of vestibular nerve section on the expression of the hyaluronan in the frog, Rana esculenta. Brain Struct Funct 212:321-334. **IF: 1,277**

### Az értekezéshez szorosan nem kapcsolódó egyéb in extenso közlemények:

Felszeghy S, **Meszar Z**, Prehm P, and Modis L. 2005. The expression pattern of hyaluronan synthase during human tooth development. Arch Oral Biol 50:175-179. **IF: 1,288**

Szigeti ZM, Matesz C, Szekely G, Felszeghy S, Bacskai T, Halasi G, **Meszar Z**, and Modis L. 2006. Distribution of hyaluronan in the central nervous system of the frog. J Comp Neurol 496:819-831. **IF: 3,831**

*A megjelent közlemények összesített impact faktora: 8,08*

### Idézhető kongresszusi absztrakt:

**Meszar Z**, Matesz K, Szigeti ZM, Veress G, Szekely G, Felszeghy S, and Modis L. Distribution of hyaluronan and hyaluronan-associated proteins in the spinal cord of chicken embryos. Febs Journal 1, 273. 2005.

### Egyéb kongresszusi absztraktok:

**Meszar Z**, Szekely G, Matesz K, and Modis L. Hyaluronan distribution pattern in developing spinal cord of chicken embryos. Clinical Neuroscience 1, 45-46. 2004.

**Meszar Z**, Szigeti ZM, Matesz K, Veress G, Szekely G, Felszeghy S, and Modis L. Hyaluronsav és hyaluronsavhoz kapcsolódó proteinek megoszlása a fejlődő csirkeembryo gerincvelőben. XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai napok 1, 173. 2005.

**Meszar Z**, Matesz K, Szigeti ZM, Szekely G, Felszeghy S, and Modis L. Expression of hyaluronan and hyaluronan binding proteins during spinal cord development of chicken embryos. Clinical Neuroscience 1, 66-67. 2005.

Szigeti ZM, **Meszar Z**, Matesz K, Modis L, and Szekely G. Expression of extracellular matrix molecules during optic nerve regeneration in the frog. Clinical Neuroscience 1, 62. 2005.

Szigeti ZM, **Meszar Z**, Matesz K, Bacskai T, Szekely G, and Modis L. Distribution of the extracellular matrix molecules in the visual system of the frog. Clinical Neuroscience 1, 61-62. 2006.

Racz E, **Meszar Z**, Veress G, Modis L, Szekely G, and Matesz K. Composition of the perineuronal net of motoneurons in the brain stem. *Clinical Neuroscience* 1, 54-55. 2007.