

**A VESTIBULARIS RENDSZER CENTRÁLIS
KAPCSOLATAI ÉS REGENERÁCIÓJA**

DR. HALASI GÁBOR

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI



TÉMAVEZETŐ: DR. MATESZ KLÁRA

Debrecen, 2005

1. BEVEZETÉS

A vestibularis rendszer feladata az izomtónus szabályozásán keresztül a test mindenkori helyzetének megtartása a gravitáció ellenében. A testhelyzet folytonos változásának következtében állandó információáramlás történik a perifériás receptorok felől az agytörzsi vestibularis magokba, ahol egy rendkívül komplex ingerület feldolgozás történik. Az innen származó ingerület szabályozza az izomtónust, biztosítja a fej helyzetének megváltozását követő reflexes szemmozgást és befolyásolja a vegetatív központok működését is. Az egyensúlyozó szerv összetett érzékszerv, melynek lényegi része, a tágabb értelemben vett labirintus már a primitív, vízben élő gerinceseknél is megtalálható, mint áramlásregisztráló érzékszerv. Ez a része megtartotta funkcióját, és a filogenesis magasabb fokán álló élőlényeknél is hasonló elveken működik. A receptorok egy része módosult formában megőrizte ezt a működését, és más idegrendszeri területekkel együtt az egyensúlyozó rendszert alkotja. Az egyensúlyozó receptorok közül a szöggyorsulást érzékelő, félkörös ívjáratokban elhelyezkedőket ampullaris receptoroknak is nevezik. A lineáris gyorsulásra érzékeny receptorok, az otolith vagy macularis szervek a sacculusban, utriculusban és alacsonyabb rendűekben a lagaenában helyezkednek el. A receptorokat ellátó primer neuronok axonjai a nervus vestibulocochlearisban haladnak az agytörzs felé, ahol az egyensúlyozó és a halló magokban végződnek. Az itt található másodlagos neuronok a központi idegrendszer különböző területeivel létesítenek kapcsolatot.

Számos vizsgálat ellenére ma sem tudjuk pontosan, hogy az egyedi vestibularis magok milyen szerepet játszanak a vestibularis rendszer fiziológiás működésében. Az egyes magok között lévő funkcionális különbségek oka feltehetően összefügg az egyensúly érző receptorok eltérő agytörzsi projekciójával, és az egyes magok különböző központi idegrendszeri összeköttetésével. Nagyon kevés adat van arra vonatkozóan, hogy a vestibularis magok végződési területei közül melyek azok, amelyek közvetlen reciprok kapcsolatban vannak a kiindulási állomással. A vestibularis rendszer normál kapcsolatainak morfológiai vizsgálata rendkívül fontos lépés ahhoz, hogy a nervus vestibularis lézióját követő változásokat megismerhessük. A lézió következtében magasabb rendű gerincesekben a tünetek kompenzálódása figyelhető meg, alacsonyabb rendű gerincesekben a kompenzációt követően regeneráció indul meg. A lézió és a kompenzáció során bekövetkező élettani változások megértéséhez feltétlenül szükséges a normál kapcsolatok fény- és elektronmikroszkópos szintű megismerése.

Az utóbbi időben egyre több adat szól amellett, hogy az extracelluláris mátrix (ECM) makromolekulái fontos szerepet játszanak az idegrendszer fejlődésében,

szerveződésében, és e molekulák jelenléte illetve hiánya befolyásolja az idegrendszer regenerációs készségét. Az ECM szerepét az idegi regenerációban korábban elsősorban *in vitro* körülmények között vizsgálták. Napjainkban egyre több *in vivo* vizsgálattal kívánják felderíteni az ECM makromolekulák regenerációban betöltött szerepét. Az *in vivo* vizsgálatokra alkalmas modell a kétéltűek vestibularis rendszere, ahol a plaszticitás és a regeneráció háttérében álló mechanizmusok és ezen belül az ECM szerepe egyaránt vizsgálható. Kevés *in vivo* adat van arról, hogy az ECM makromolekuláinak és receptorainak eloszlása hogyan módosul a vestibularis lézió és kompenzáció során, milyen változások következnek be a jelátviteli mechanizmusokban és a neurotranszmitterek expressziójában.

2. CÉLKITŰZÉSEK

2.1. A vestibularis magok centrális kapcsolatai

Vizsgáltuk a **nucleus vestibularis descendens** (NVD) antero- és retrográd kapcsolatait patkányban, amely korábbi, az intézetünkben folyó, a többi vestibularis mag centralis kapcsolatainak feltérképezését szolgáló munkák folytatása.

A nucleus vestibularis descendens antero- és retrográd kapcsolatainak megismerésén túl megkezdtük a vestibularis magok centrális kapcsolatainak ultrastrukturális vizsgálatát is. E munka első lépéseként a **nucleus vestibularis superior** (NVS) kapcsolatait tanulmányoztuk a nucleus oculomotorius motoneuronjaival és a nucleus ruber idegsejtjeivel.

A vestibularis magok összeköttetések a megismerésével választ kaphatunk arra, hogy a magok milyen központi struktúrákkal létesítenek kapcsolatot. Ezek ismeretében további kísérletek tervezhetők az egyedi vestibularis magok szerepének megismeréséről a vestibularis léziót követő tünetek kialakulásában és az azt követő kompenzációban. A rendszer kapcsolatainak felderítése így klinikai szempontból is jelentős, hiszen a vestibularis rendszer kóros működése kapcsán kialakuló tünetek, majd azok kompenzálódásának neuronális háttere csak a normál szerkezet és működés ismeretében lehetséges.

2.2. Az extracellularis matrix makromolekuláinak és feltételezett receptorainak megoszlása az idegrendszerben

Az ECM makromolekulák idegi regenerációban betöltött szerepének megismeréséhez vizsgáltuk a **hyaluronsav**, **laminin**, **tenascin C**, **fibronektin** és a **phosphacan** molekulák normál eloszlását a béka idegrendszerében. Ennek kiegészítéseként tanulmányoztuk az ECM egyik feltételezett receptorának, a **dystrophin-glycoprotein komplex** (DGC) egyes komponenseinek megoszlását a béka idegrendszerében. Az így megismert eloszlási mintázatok referenciaként szolgálhatnak a regenerációs kísérletekben.

2.3. A hyaluronsav és a laminin lehetséges szerepe a vestibularis regenerációban

In vivo kísérletekben vizsgáltuk a hyaluronsav és a laminin megoszlásának változását a vestibularis ideg átvágását követő regeneráció során békákban. A változások időbeli lefolyása adatokat szolgáltatathat az ECM permisszív és non-permisszív szerepéről az idegi regenerációban.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti állatok

A vestibularis magok kapcsolatainak feltérképezéséhez felnőtt Wistar patkányokat használtunk, altatásukhoz intraperitonealisan injektált uretánt alkalmaztunk. Az ECM makromolekulák és a DGC alkotóelemeinek vizsgálatához, valamint a nervus vestibulocochlearis regenerációjának tanulmányozásához kecskebékákat (*Rana esculenta*) használtunk. A békákat tricain-metan sulfonattal (MS-222) altattuk.

3.2. Pályakövetéses módszerek

A nucleus vestibularis descendens (NVD) kapcsolatainak feltérképezését neurobiotin (NB) alkalmazásával végeztük. A neurobiotint az axonvégzódések és a dendritek is felveszik, így egyidejűleg lehetséges az antero- és a retrográd kapcsolatok felderítése. A nucleus vestibularis superior (NVS) és a nucleus n. oculomotorii illetve a nucleus ruber kapcsolatainak ultrastruktúrális vizsgálatára a *Gerfen és Sawchenko (1984)* által először alkalmazott jelölőanyagot, a Phaseolus vulgaris – leukoagglutinint (PHA-L) használtuk. Ez a jelölőanyag patkányban csak anterograd irányban transzportálódik. Kísérleteinket felnőtt Wistar patkányokon végeztük, altatást követően az állatok fejét stereotaxiás készülékben rögzítettük. A fejtető bőrén metszést ejtettünk, a koponyacsontokat szabaddá tettük és a koponyát fogászati fúró segítségével megnyitottuk. A jelölőanyagot üveg mikroelektroda segítségével iontoforézissel a NVD-be illetve a NVS-ba injektáltuk. A megnyitás és az injektálás helyét *Paxinos és Watson (1998)* által szerkesztett atlaszban megadott sztereotaxikus koordináták alapján állapítottuk meg. Az injektálás egyenárammal történt, 20 percig szakaszosan (5 μ A áramerősséggel 7s injektálás, 3s szünet). A jelölőanyagok axonalis transzportidejétől függően az állatokat 7-14 nap után újra elaltattuk, és transcardialis perfúzióval fixáltunk. Az eltávolított agy és gerincvelő blokkokból 60 μ m vastag metszeteket készítettünk fagyasztó mikrotómmal, az elektronmikroszkópos feldolgozás esetében pedig vibratómmal. Neurobiotin esetében a jelölést avidin-biotin complex (ABC) illetve Ni-DAB reakcióval tettük láthatóvá.

3.3. Elektronmikroszkópos vizsgálatok

A PHA-L-al jelölt, 60 μ m-es agytörzsi metszeteknek a mesencephalont tartalmazó részeit használtuk. A preembedding immunhisztokémiai folyamat során a metszeteket normál kecske-szérumban oldott biotinilált anti-PHA-L-nel (1:2000) 4°C-on 2 napig inkubáltuk. A jelölést ABC és DAB kromogén reakcióval tettük láthatóvá. Az ozmium tetroxidos kezelés

után a nucleus nervi oculomotorii-t és a nucleus rubert tartalmazó metszeteket ágyasztuk be műgyantába (Durkupan ACM). A postembedding immunhisztokémiai folyamat során – a gyanta és az ozmium eltávolítása után – a PHA-L-nel azonosított terminálisok feltételezett gamma-amino-vajsav (GABA) kimutatása történt (anti-GABA, 1:1000). Az 1%-os bovine-serum albuminnal történő inkubálás után a reakció során kialakult fehérje-antitest komplexhez olyan szekunder antitestet kötöttünk (immunogolddal konjugált kecske-anti nyúl IgG, 1:20), amelyhez 20 nm-es aranyzemcse volt kapcsolva. A vizualizáláshoz uranil acetáttal, majd ólom-citráttal kontrasztoltuk metszeteinket.

3.4. Az extracelluláris mátrix (ECM) makromolekuláinak illetve receptorának, a dystrophin-glycoprotein (DGC) komplex alkotóelemeinek kimutatása béka idegrendszerében

Az ECM makromolekulák és a DGC komplex elemei eloszlásának vizsgálatához kecskebékát (*Rana esculenta*) használtunk, melyeket altatást követően transcárdialisan perfundáltunk izotóniás sóoldattal. Az eltávolított gerincvelőt és agyat a spinalis és cranialis idegek kezdeti szakaszával együtt Sainte Marie fixáló oldatba (99% abszolút alkohol, 1% 96%-os ecetsav) helyeztük. A kivett készítményeket paraffinba ágyasztuk, majd 10 µm-es metszeteket készítettünk. Deparaffinálást követően a metszeteken az ECM és a DGC egyes makromolekuláinak kimutatására alkalmas próbát vagy immunhisztokémiai reakciókat végeztük el. A hyaluronsav detektálásához egy specifikus biotinilált hyaluronsav-kötő próbát (bHABC, 1:10; 5 µg/µl) (Raija Tammi és Markku Tammi jóvoltából a Kuopioi Egyetem Anatómiai Intézetéből kaptuk) használtunk mely az aggregán hyaluronsav-kötő egységhez kapcsolt biotin molekulából áll, így lehetőséget ad a poliszacharid hyaluronsav kimutatására. Negatív kontrollként olyan metszeteket használtunk, amelyeket vagy nem inkubáltunk bHABC-vel vagy pedig a bHABC-vel való inkubálás előtt *Streptomyces* hyaluronidázzal előemésztettünk. Pozitív kontrollként béka sternum porc szolgált. A többi extracelluláris mátrix molekula kimutatását a következő primer antitestekkel végeztük: anti-humán tenascin-C (1:4000), anti-csirke phosphacan (1:40), anti-humán fibronectin (1:400) és anti-egér laminin (1:200). A primer antitesttel való inkubálást követően a metszeteket specifikus biotinilált szekunder antitestekkel inkubáltuk. A hyaluronsav próba (bHABC) és az immunreakciók vizualizálásához avidin-biotin (ABC) komplexet és DAB-ot használtunk. Negatív kontrollként a primer antitestekkel nem kezelt metszeteket használtuk. Laminin, tenascin C és fibronectin esetén pozitív kontrollként a béka veséből készült metszetek szolgáltak, míg a phosphacan pozitív kontrollként a patkány és béka kisagyból készült metszeteket használtuk.

A DGC makromolekulái közül a dystrophin és a β -dystroglycan kimutatására primer antitestként egér-anti-dystrophint (Dys2, 1:25) és nyúl-anti- β -dystroglycant (BDG, 1:200) majd szekunder antitestként biotinilált kecske-anti-egér IgG-t (1:500) és biotinilált kecske-anti-nyúl IgG-t (1:500) alkalmaztunk. Az immunreakciót extravidinnel és DAB kromogén segítségével vizualizáltuk. Fluorescens és konfokális pásztázó lézer mikroszkópos vizsgálatokhoz az anti-dystrophin kimutatásához Cy3-kapcsolt anti-egér-IgG, és az anti-BDG kimutatásához FITC-konjugált anti-nyúl-IgG szekunder antitesteket használtunk.

3.5. A nervus vestibularis regenerációjának vizsgálata

A vestibularis ideg átvágásához a békák agytörzsét ventrális irányból tártuk fel, úgy, hogy a szájnyalkahártyán metszést ejtettünk majd a koponyát ventralis irányból megnyitottuk. A VIII. agyideget feltártuk majd az agytörzsbe történő belépésétől kb. 1 mm-re distalisan, de a ganglion vestibulare-tól medialisán átvágtuk (postganglionáris axotómia) és a vágott végeket repositionáltuk. Az állatok a műtétet követően 3-84 napig túléltek, majd a megfelelő túlélési időt követően az ECM molekulák kimutatásánál leírtak szerint az agytörzsből horizontális metszeteket készítettünk, melyeken a HA és a laminin kimutatására alkalmas próbát illetve immunhisztokémiai reakciót végeztünk. A regenerálódó axonokat neurobiotin jelöléssel mutattuk ki.

A nervus vestibularis regenerációja során bekövetkező HA eloszlási mintázat változás kvantitatív analíziséhez a fénymikroszkópos felvételeken Image J software segítségével mértük az optikai denzitást az operált és az intakt oldali belépési zónában (TZ) és a nucleus vestibularis medialis (NVM) illetve lateralis (NVL) területén. A mért adatokat statisztikai analízis alá vetettük. A mérési hibák kiküszöbölése érdekében előzetesen két-tényezős ANOVA teszttel kimutattuk, hogy nincs szignifikáns különbség az egy állatból származó különböző metszetek és a különböző állatokból származó identikus struktúrákat tartalmazó metszetek között. A HA reakció intenzitását a különböző postoperatív napokon két-mintás t-próbával hasonlítottuk össze. Az intenzitás változások várható irányát a lineáris regressziós egyenesek meredekségének tesztelésével, míg az ép és az operált oldalak közötti lehetséges összefüggéseket Fisher-féle exact teszttel vizsgáltuk. Az egyes struktúrák HA reakció intenzitásának összehasonlításához, illetve a változások várható irányának teszteléséhez a reakció intenzitás-értékeinek normalizálására volt szükség. Az adatok normál eloszlását két kritérium szerint teszteltük: (1) $0,9 < \text{median/mean} < 1,1$ és (2) $3 \cdot \text{standard deviáció} < \text{mean}$. A változások egyenlőségét (equality of variances) F-teszt segítségével ellenőriztük.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1. A nucleus vestibularis descendens (NVD) kapcsolatainak vizsgálata patkányban

A NVD-be történő neurobiotin injekciót követően a jelölőanyag kb. 200 µm távolságra diffundált a NVD rostralis részén. Az előhívott neurobiotin fekete színben vált láthatóvá egy kör alakú területen és az axonok, végződéseik valamint a sejtek is fekete színben jelentek meg.

4.1.1. Anterográd projekció

A legrostralisabb axonokat és végződéseket a **diencephalon** területén találtuk elsősorban az azonos oldalon, a végződési területek a thalamus nucleus ventralis posteromedialisában és a zona incerta területén voltak. Ez a lelet összhangban van azoknak a korábbi vizsgálatoknak az eredményeivel, miszerint a nucleus posteroventralis thalami a vestibularis rostok elsődleges végződési helye, és ez a terület a zona incerta mellett a somaticus és a vestibularis bemenetek fontos integratív központjának is tekinthető, amely fontos szerepet játszik a testhelyzet fenntartásában. A **mesencephalon** területén a NVD rostjai a fasciculus longitudinalis medialisban haladva a verticalis szemmozgások koordinálásáért felelős nucleus Darkschewitch-et és contralateralis dominanciával a nucleus interstitialis Cajal-t érték el. Az oculomotorius és trochlearis magban mindkét oldalon megtalálhatóak voltak a NVD eredetű terminalisok. A NVD-ből eredő végzések száma a szemmozgató agyidegi magokban kevesebb volt, mint a nucleus vestibularis superior (NVS) és medialis (NVM) esetében, mely alátámasztja azokat a fiziológiai megfigyeléseket, amelyek szerint a vertikális szemmozgások szabályozásában elsősorban a NVS-nak és a NVM-nak van fontos szerepe, míg ebben a vonatkozásban a NVD szerepe kisebb. A NVD másik fő mesencephalikus végződési területe a mozgató rendszerhez tartozó egyik fontos átkapcsoló állomás, a **nucleus ruber** volt, mely kapcsolatáról az irodalomban eddig utalást nem találtunk. Új eredményként értékelhetjük, hogy az injekcióval ellentétes oldalon gazdag terminalis területet találtunk a nucleus ruber parvocellularis és magnocellularis részében. A nucleus ruber corticalis és cerebellaris rostokat fogad, innen indul a rubrospinalis, rubrobulbaris és a rubroolivaris pálya is. A parvocellularis rész elsősorban a kisagyból kap bemenetet, és az itt kialakuló neuronális körnek a legfőbb kimenete a rubrothalamicus pálya, amely végül a motoros, premotoros és parietalis kéregben végződik. A kérgi területek reciprok kapcsolatban vannak a nucleus ruberrel. A rubrospinalis pálya a nucleus ruber magnocellularis részéből ered. Eredményeink azt jelenthetik, hogy a vestibularis rendszer nemcsak indirekt módon, hanem közvetlenül is befolyásolja a nucleus ruber működését. A **híd** magasságában az

ipsilateralis rostok legnagyobb mennyiségben a nucleus vestibularis lateralis (NVL), a NVM és a NVS területére voltak követhetők, ezeket a kapcsolatokat intrinsic összeköttetéseknek nevezik. A rostok másik csoportja a nucleus tractus spinalis nervi trigeminiben (nspV) végződött. A medialis irányba haladó rostok egy része a nervus facialis térdétől rostralisán haladva érte el az azonos oldali abducens magot. A formatio reticularis paragigantocellularis és intermediar részén is találtunk végződéseket. Az injekció területéről nagyszámú un. commissuralis rost volt követhető az ellenoldali NVS, NVM, NVL és NVD területére. Vizsgálataink alapján úgy tűnik, hogy patkány vestibularis magjai közötti commissuralis kapcsolatok kialakításában a NVM mellett a NVD vesz részt a legerőteljesebben. A kétoldali vestibularis magok közötti kapcsolatnak fontos szerepe van a vestibularis léziót követő kompenzáció során. Az ellenoldali abducens mag és nspV kevesebb végződést tartalmazott, mint az ipsilateralis identikus magok. Az abducens maggal való kapcsolat azt jelentheti, hogy a NVD is szerepet játszhat a horizontális szemmozgások szabályozásában. Az ellenoldali formatio reticularisban talált végződési terület hasonló volt az azonos oldaléhoz. A NVD caudalis irányban haladó rostjai a fasciculus longitudinalis medialisban voltak. Az ebből leváló rostok a **nyúlvelőben** a nucleus gracilis és cuneatus, a nspV, a nucleus tractus solitarii, a nucleus prepositus hypoglossi, formatio reticularis ventralis és dorsalis részében és a NVM illetve NVD caudalis részeiben végződtek. A formatio reticularissal való kapcsolat megerősíti azt a feltételezést, hogy a vestibularis rendszer e kapcsolaton keresztül képes befolyásolni a vegetatív idegrendszer működését, és hatással van a motoros szabályozásra is. A nucleus prepositus hypoglossiból eredő rostok egy része a cerebellumban végződik és e mag rostokat fogad a gerincvelői nucleus cervicalis centralisból, így módon a gerincvelői proprioceptív és a vestibularis bemenetek integrálásában és az információ kisagy felé történő továbbításában játszik fontos szerepet. A vestibularis rendszer agytörzsi érző magokkal való kapcsolata már korábban is ismert volt, és ezekben a magokban a vestibularis input erősen befolyásolja a nyaki izomzatból érkező sensoros információ feldolgozását. Az oliva inferior elenyésző számban tartalmazott rostokat és végződéseket. A leszálló rostokat a **gerincvelő** thoracalis szakaszáig tudtuk követni, ahol a rostokat a fehérállományban minden kötegben megtaláltuk, legnagyobb számban az ipsilateralis funiculus anteriorban és a funiculus lateralis elülső részében. A rostok legnagyobb számban a cervicalis szegmentumokban végződtek, kevesebbet találtunk a thoracalis szakaszon. A végzések legnagyobb részét az azonos oldali szürkeállomány V, VII, VIII, és IX. Rexed laminában találtuk. A nyaki szakaszon elhelyezkedő nucleus cervicalis centralis a legtöbb végződést ipsilateralisan fogadta. A fasciculus longitudinalis medialis

leszálló rostjai a nyaki gerincvelő területén a tarkó és nyakizmok beidegzését látják el, ezáltal a testmozgások során a fej megfelelő kompenzáló elmozdulását okozzák. Az axiális izomzat motoneuronjai a gerincvelő elülső szarv medialis részén helyezkednek el, és ezek közvetlen vestibularis hatás alatt állnak.

4.1.2. Retrográd projekció

A neurobiotin olyan jelölőanyag, amely alkalmas a retrográd jelölődött sejtek feltérképezésére is. Ezen neuronok pontos helyzetét NeuroLucida segítségével rekonstruáltuk. Nem találtunk sejteket a diencephalonban és a mesencephalonban sem. A **rhombencephalon rostralis részében** mindkét oldali vestibularis magokban, a formatio reticularis parvocellularis, gigantocellularis és intermediier részében, a nucleus prepositus hypoglossiban és a nucleus tractus spinalis nervi trigeminiben találtunk retrográd jelölődött sejteket. A **rhombencephalon caudalis részében** retrográd jelölődött sejtek voltak láthatóak a hátsókötegi magokban, a nucleus gracilisben és cuneatusban, nucleus spinalis nervi trigeminiben, a nucleus tractus solitariiben, a nucleus prepositus hypoglossiban és a formatio reticularis intermediier, parvocellularis és gigantocellularis részében. Nem találtunk retrográd jelölődött sejtet a gerincvelő szintjében. Eredményeink szerint a retrográd jelölődött sejtek mindig csak olyan helyen voltak, ahová a nucleus vestibularis descendens is küldött rostokat.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a vestibularis magrendszer projekciójának ismerete hozzásegíthet ahhoz, hogy a gyakran előforduló vestibularis zavarok és az ezt követő kompenzáció mechanizmusának neuronális hátterét megérthessük. A másodlagos vestibularis neuronok olyan területekre is projiciáltak, ahová proprioceptív impulzusok is érkeznek, ezért úgy gondoljuk, hogy a kétféle sensoros modalitás konvergenciája fontos lehet a test egyensúlyi helyzetének megtartásában.

4.2. A NVS kapcsolata a nucleus oculomotorius-szal illetve a nucleus ruber-rel

A NVS-ba történt PHA-L injekciót követően a jelölt rostok és terminálisok az idegrendszer különböző területein figyelhetők meg, többek között a nucleus oculomotoriusban és a nucleus ruber magnocelluláris részein. A PHA-L-al jelölt boutonok elsősorban a sejttestekkel és a proximális dendritekkel voltak szoros kapcsolatban mindkét mag esetében. Ultrastrukturális szinten jól látható volt, hogy a PHA-L jelölt boutonok mind a két magban szinte kizárólag preszinaptikusan helyezkedtek el és szimmetrikus szinapszisokat alakítottak ki. Az oculomotorius magban 166 PHA-L-al jelölt bouton közül 133 axodendritikus, 29 axosomatikus, 4 pedig axoaxonikus kapcsolatot alkotott. A nucleus ruberben ezen kapcsolatok száma 47, 16 és 2 volt. A GABA immunhisztokémiai reakció

alkalmazásával a NVS-ből eredő PHA-L-al jelölt terminálisok többsége GABA pozitív volt mind a nucleus oculomotorius-ban, mind a nucleus ruberben, míg a posztszinaptikus képletek GABA negatívak voltak. Ez a leletünk alátámasztja a korábbi fiziológiai vizsgálatok eredményeit, melyekben e kapcsolatok gátló jellegét írták le. Ez alapján elmondhatjuk, hogy a vertikális félkörös ívjáratokkal asszociált gátló vestibularis neuronok a NVS-ban találhatóak. A NVS-ből eredő axonok szimmetrikus gátló, GABAerg kapcsolatot alakítottak ki a nucleus ruber magnocellularis részén található sejtestekkel és proximális dendritekkel. A nucleus rubernek fontos szerepe van a motoros aktivitás koordinációjában. Eredményeink alapján feltételezhetjük, hogy a NVS közvetlenül módosíthatja a cortico-rubralis és cerebello-rubralis útvonalak aktivitását a nucleus ruber neuronjainak gátlásával.

4.3. Az extracelluláris mátrix (ECM) molekulák normál eloszlása a béka idegrendszerében

Jelen munkánkban az ECM makromolekulái közül először mutattuk ki a hyaluronsav és a phosphacan jelenlétét a felnőtt békák idegrendszerében, illetve a tenascin, a fibronectin és a laminin idegrendszeri eloszlásáról részletes térképet készítettünk.

Ép állatokban a **hyaluronsav** (HA) próba negatív volt a gerincvelői idegek és az agyidegek gyökerében, míg ezek belépési vagy transitionális zónájában (TZ) erősen pozitív volt. A rostoknak központi idegrendszerbe történő belépése után a reakció erőssége csökkent, ahol a fehérállomány pozitív HA reakciót mutatott az egész neuraxisban különösen a tractus spinalis n. trigemini, a tractus vestibulocochlearis és a gerincvelőből felszálló pályák mentén. A szürkeállományban a HA pozitívitás granuláris formában jelent meg, és erős reakciót figyeltünk meg egyes idegsejtek, elsősorban a somatomotoros agyidegi magok neuronjainak perikaryonja és nagyobb dendritjeik kezdeti szakaszai körüli perineuronal net-ben (PN). HA pozitív PN-t találtunk a sensoros agyidegi magokban valamint a gerincvelői motoneuronok körül. A HA idegrendszeri eloszlása hasonló az eddig vizsgált fajokhoz, ezért feltételezhetően szerepe is hasonló lehet a béka idegrendszerben. A perifériás idegekben permisszív szerepét, míg a látóidegrendszerben gátló szerepét mutatták ki a regeneráció során patkányokban. A TZ területén a HA-nak feltehetőleg barrier funkciója van. Emellett a HA hasonlóan más fajokhoz, békában is részt vesz a PN alkotásában. Irodalmi adatok szerint a PN-ben a HA a sejtekhez receptorain, a CD44-en és a RHAMM-on keresztül kapcsolódik.

A **laminin** immunreakció (IR) nagyon erős volt a perifériás idegek gyökerében és belépési zónájában, ahol a TZ-ra jellemző szerkezetnek megfelelően a laminin pozitív

terület kisebb kötegekben benyúlt a központi idegrendszer területére. A központi idegrendszerben az agyburkok és az erek lamina basalis kivételével laminint nem tudtunk kimutatni. A laminin eloszlását a többi fajban is hasonlóan találták mint ahogyan a mi eredményeink mutatják, azonban fejlődő ebihalakban megtalálható a központi idegrendszer egyéb struktúráiban is. A lamininnak fontos szerepet tulajdonítanak az idegsejt migrációban és az axon-növekedésben, és serkenti a sérült idegsejtek regenerációját is.

A **tenascin-C** immunreakció eloszlása hasonló képet mutatott a HA reakcióhoz. A perifériás idegekben gyenge tenascin-C immunreaktivitás (IR) volt megfigyelhető, míg a TZ-ban az intenzitás erőssége jelentősen megemelkedett, és az immunreakció intenzitása a fehérállományban a rostok körül sem csökkent. Az agytörzsi szürkeállomány neuropilje gyengén festődött, a vestibularis magkomplexben a neuronok körül a PN erősen pozitív volt. Emlősökben a tenascin-C nagy mennyiségben mutatható ki a TZ-ban, és ezt a molekulát is felelőssé teszik felnőtt korban az axonregeneráció sikertelenségéért. A tenascin-C-nek fontos szerepe van a PN-ben található chondroitin-szulfát proteoglycanok összekapcsolásában. Ismert az is, hogy a tenascinok jelenléte a PN-ben megakadályozza új szinaptikus kapcsolatok kialakulását felnőtt korban. Más adatok szerint azonban a tenascin elősegíti az idegi regenerációt a központi idegrendszerben, ugyanis olyan helyeken expresszálódik ahol nagy az idegi plaszticitás, fokozza a sejt-migrációt, idegi léziót követően reexpresszálódhat a felnőtt idegrendszerben.

A **phosphacan** immunreakció enyhén pozitív volt a perifériás idegek gyökerében, azonban jóval erősebbnek mutatkozott a TZ-ban. Az agytörzsi fehérállományban a tractus vestibuláris területén a rostokat erős phosphacan pozitív állomány vette körül. A vestibuláris magok idegsejtjei körül egy erősebb phosphacan IR pozitív PN volt látható. A gerincvelőben a phosphacant elsősorban a fehérállományban és a motoneuronok körüli PN-ben tudtuk kimutatni. A TZ-ban eddig a chondroitin-szulfát proteoglycanok közül csak a hyalektinek (versican, neurocan, brevican) jelenlétét írták le. Az idegrendszer regenerációjában egyes esetekben permisszív, máskor non-permisszív szerepét mutatták ki, mivel chondroitin-szulfát oldalláncaik gátolják, core proteinjeik pedig serkentik az idegnyúlványok növekedését.

A **fibronektin** immunreakció erős volt a perifériás idegrendszerben az axonok körüli területen és a belépési zónában. Az IR intenzitása a fehérállományban inhomogén volt, legerősebbnek a commissuralis rostok területén bizonyult. A szürkeállomány neuropiljében gyengébb, míg a PN-ben erősebb volt a fibronektin IR pozitivitása, kivéve a gerincvelőt, ahol a PN alig volt felismerhető. Egyes idegsejtek cytoplasmájában

kimutatható volt a fibronectin. Ismert, hogy a fibronectin fontos szerepet játszik a vestibularis Schwann sejtek osztódásának elindításában, ezzel magyarázható erős expressziója a nervus vestibulocochlearisban. A fibronectin fehérállományon belüli egyenlőtlen eloszlásának nem tudjuk a magyarázatát, de elképzelhető, hogy a commissuralis rostok területén más a gliasejtek megoszlása. Az idegrendszer fejlődése során az astrocyták serkentik az axon növekedést, amit az általuk termelt fibronectin hatásának tulajdonítanak, azonban ezt a képességüket később elveszítik. Más irodalmi adatok szerint a központi idegrendszer neuronjainak növekedése gátolt fibronectin jelenlétében, és talán ezzel magyarázható jelenléte a PN-ben. A fibronectin kettős hatása receptorainak eltérő eloszlásával magyarázható. Az idegsejtek cytoplasmájában a fibronectin jelenléte arra utal, hogy e molekulát a neuronok is termelik.

4.4. A dystrophin-glycoprotein komplex elemeinek eloszlása a béka idegrendszerében

A **dystrophin** (Dys2) IR a perifériás idegekben negatív volt, azonban a TZ-ban a reakció erősebbnek bizonyult. Az agytörzsi fehérállomány negatív volt, kivétel az agytörzs laterális része, ahol a vestibulocerebellaris és spinocerebellaris pályák is haladnak, és a pozitivitás egészen a kisagyi szemcsesejtek területéig volt követhető. A NVL-ban a perikaryonok pozitívak voltak, míg a NVM-ban kevésbé volt erős a reakció. A gerincvelői hátsó köteg erős dys2 pozitivitást mutatott az axonok körüli területen, míg a szürkeállomány negatív volt. Korábbi irodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy békában is a gliához asszociált a dystrophin.

A perifériás idegekben a **beta-dystroglycan** immunreakció intenzitása erősebb volt, összehasonlítva a központi idegrendszer fehérállományával. A NVM és NVL területén az idegsejtek perikaryonja erősen pozitív volt, egyes sejtek cytoplasmája és proximális dendritje is pozitív reakciót mutatott.

Kettős immunhisztokémiai jelöléssel azt találtuk, hogy a kisagyi területén a Purkinje sejtek cytoplasmája BDG pozitív, míg a vestibulocerebellaris rostok, amelyek a szemcsesejteken végződnek, Dys2 pozitívak voltak. A NVM területén a nagyobb idegsejtek perikaryonjaiban pozitív reakciót találtunk mind BDG-ra, mind dystrophin-ra, azonban egyes sejtek cytoplasmája csak BDG pozitivitást mutatott. Az idegsejtek közötti neuropil Dys2 pozitív volt. A nervus vestibulocochlearis perifériás részében az axonok körül csak BDG pozitív reakciót figyelhattunk meg, míg a belépési zónában illetve a központi idegrendszerben található vestibularis rostok körül kettős jelölés volt látható. Az erek és kapillárisok membrana basalis pozitív reakciót mutatott. Korábbi irodalmi adatok

alapján, más fajokban is a központi idegrendszer egyes területein a β -dystroglycan kolokalizál a dystrophinnal.

Irodalmi adatok szerint a DGC molekulái közül a dystrophin és a β -dystroglycan is megtalálható szinapszisokhoz asszociáltan. E molekulák hatását a pre- és postszinaptikus neuronokra a szinaptikus részbe ürülő neurotranszmitterek hatására aktiválódó matrix-metalloproteinázok (MMP) képesek módosítani. Az MMP-k aktiválódása laminin hatására is történhet, amely azt is jelentheti, hogy a laminin ezen az úton keresztül is elősegítheti a regenerációt és a szinaptogenezist. Valószínűleg ezen a molekuláris kapcsolaton keresztül befolyásolhatja a laminin és a DGC is a GABAerg szinapszisok működését.

4.5. A nervus vestibulocochlearis regenerációjának vizsgálata

A vestibularis deafferenciációt követően az állatok a vestibularis lézióra jellemző tüneteket mutattak, majd műtétet követő 6. héttől a lézióra jellemző tünetek fokozatosan megszűntek.

4.5.1. A regenerálódó rostok neurobiotin jelölése

A korábbi axotómiától distalisan átvágott VIII. agyideg proximális végére helyezett Neurobiotin megfelelő transzport idő után kimutatható volt a nervus vestibulocochlearisban és az agytörzsben is. Az agytörzsbe történő belépéskor a rostok egy felszálló és egy leszálló köteget alkottak, a regenerálódott tractus vestibularis a normál állatokhoz képest lateralisán helyezkedett el. A legtöbb rost a NVD-ban és az NVL-ban volt, míg az NVM-t és az NVS-t kevesebb rost érte el. A rostok megoszlása és morfológiája a vestibularis magkomplexen belül hasonló volt a korábbi irodalmi adatokhoz.

4.5.2. A hyaluronsav eloszlási mintázatának változása post-ganglionáris vestibularis axotomiát követően

Az axotómiát követő harmadik naptól megemelkedett a HA reakció intenzitása a **VIII. agyideg perifériás részében**, az átvágásától distalisan, az intenzitás maximuma a 42. postoperatív napon volt megfigyelhető.

A vestibularis axotómiát követő regeneráció során **belépési zónákban** az 5. postoperatív napon a HA próba intenzitása mindkét oldalon meghaladta a kontroll (nem operált) állatokban mért HA intenzitást. A legmagasabb denzitást az ép és a kezelt oldalon is a 14. post-operatív napon észleltük. A 14-21. napok közötti intervallumban az operált oldalon a reakció intenzitása csökkent, majd a 21-81. nap között az operált oldalon nem volt szignifikáns változás. Az ép oldalon is hasonló irányban alakult a HA próba intenzitásának változása, kisebb ingadozással. A TZ területén lévő barrier csak a postembrionalis életkorban alakul ki, ezt követően megakadályozza a periféria felől az

axonok benövését a központi idegrendszerbe. A TZ-ban a glia sejtek által termelt ECM molekulákat, elsősorban a chondroitin-szulfát-proteoglycanokat (CS-PG) teszik felelőssé az axon benövés gátlásáért. E CS-PG-ok egyik fontos ligandja a HA. A HA próba intenzitásának változását a TZ-ban jelenleg nem tudjuk magyarázni, de a változás időbeli lefolyása azt sugallja, hogy a HA-nak permisszív szerepe van az axonregeneráció során a TZ-ban. A HA hasonlóan az embrionális szövetekhez, ahol permisszív hatású, feltehetőleg itt sem képez aggregátumot.

A **nucleus vestibularis medialisban** (NVM) található idegsejtek körüli **perineuronális net** a 3. postoperatív napon a környező neuropiltól alig volt megkülönböztethető, mely változás kifejezettebb volt az operált oldalon. A 3-5. postoperatív nap között nőtt a HA próba intenzitása az optikai denzitás mérései alapján, azonban ez a változás mikroszkópos vizsgálataink során nem volt szembetűnő. Az 5-7. nap között a reakció intenzitása operált oldali túlsúllyal csökkent. A 7-21. nap között az HA reakció intenzitásában nem volt szignifikáns változás, majd az ép oldalon egy gyors és intenzív növekedés volt látható a HA reakció erősségében egészen a műtétet követő 42. napig. Az operált oldalon a 28. napon a PN mikroszkópos vizsgálattal még nem volt megkülönböztethető a neuropiltól és csak ezt követően emelkedett meg HA próba intenzitása. Lineáris regresszió vizsgálatával a 7. naptól a 42. napig a reakció intenzitása fokozatosan nő az operált oldali NVM-ben. A 42-84. napok között már csak kisebb mértékű intenzitás-növekedés volt megfigyelhető, optikai denzitás méréssel ebben az intervallumban nem találtunk szignifikáns változást a HA reakció intenzitásában.

Hasonló változás volt megfigyelhető a HA próba intenzitásában a **nucleus vestibularis lateralisban** (NVL) is, ahol a 3. postoperatív napra a HA próba intenzitása annyira lecsökkent, hogy a PN megkülönböztethetetlen volt a neuropiltól, melyet az optikai denzitás mérés is megerősített. Az 5. postoperatív napra a reakció intenzitása megemelkedett, ez a változás azonban mikroszkópos vizsgálattal nem volt szembetűnő. Optikai denzitás méréssel az NVL-ban az 5-7. nap között jelentős csökkenést figyelhattunk meg, majd 7. és a 14. nap között az operált oldal intenzitásában nem volt szignifikáns változás. A 14. és a 28. postoperatív nap között gyors és intenzív növekedés volt látható a HA próba intenzitásában. Mikroszkópos vizsgálattal az operált oldalon a PN a 28. napig alig volt megkülönböztethető a neuropiltól, majd mind a két oldalon megjelent a perineuronális net kb. a 42. postoperatív napra. Optikai denzitás méréssel a 28-84. nap között nem volt szignifikáns változás, és mikroszkópos vizsgálattal sem találtunk intenzitásbeli változást a 42. nap után.

A Fisher-féle exact teszt segítségével kimutattuk, hogy az operált és az ép oldalak között nem független a HA próba intenzitásának változása. A NVD és az NVS területén is megfigyelhető volt a PN dezintegrációja majd reintegrációja a másik két maggal nagyjából azonos időbeli lefolyással, azonban e két mag kisebb jelentőséggel bír a regeneráció során, ezért ezekben nem végeztünk optikai denzitás mérést.

Az idegrendszer fejlődése során, a szinaptikus kapcsolatok kialakulását követően a PN barrier funkciót lát el. A vestibularis léziót követően a PN dezintegrációja arra utalhat, hogy a szinaptikus kapcsolatok megszűnnek és a stabilitást biztosító makromolekulák hálózata szétesik. A PN barrier funkciójának megszűnése szükséges az új szinaptikus kapcsolatok kialakulásához. A PN szerkezete a regeneráció végső fázisában helyreáll, ami azt jelentheti, hogy stabilizálódnak a kialakult új szinaptikus kapcsolatok. A PN szerkezetének kialakításához több makromolekula így a versican, brevican, Cat-301, phosphacan, tenascin-C és -R is hozzájárul, és a PN e molekulák által létrehozott szerkezetét illetve funkcióját a proteoglycanok glikozilációja tovább módosíthatja. A PN szerkezetének megváltozásához hozzájárulhat az is, hogy a mátrix-metalloproteinázok (MMP) is degradálhatják az ECM-et. A TZ-ban és a PN-ben megfigyelhető kétoldali változás feltételezett okai közé a következők sorolhatók: szisztémás hatás, amit axotomia területén kialakuló regenerációs blasztémában megjelenő sejtek által termelt különböző anyagok hoznak létre, commissuralis kapcsolatok hatására megemelkedett CD44 expresszió, illetve a GABAerg neurotranszmisszió HA-hyaluronektin általi szabályozása. A PN-ben és a TZ-ban megfigyelhető változások a különböző hosszúságú HA molekulát szintetizáló hyaluronsav-szintáz (HAS) izoformák eltérő expressziójával is magyarázhatók.

4.5.3. A laminin eloszlási mintázatának változása post-ganglionáris vestibularis axotómiát követően

Vestibularis axotómiát követően a **laminin** eloszlásában a legmarkánsabb változást az 5. postoperatív napon észleltük, amikor a laminin reakció intenzitása mind a perifériás idegekben, mind azok belépési zónájában megemelkedett mind a két oldalon. Emellett mind az ép, mind az operált oldalon intenzív laminin reakciót mutattunk ki az agytörzs laterális részén, a tractus vestibulocerebellaris és a tractus vestibulospinalis normál lefutásától laterálisan. Pozitív laminin immunreakciót láttunk mindkét oldalon a vestibularis magok neuropiljében, a NVM kivételével. Ezt követően a laminin reakció intenzitása csökkenő tendenciát mutatott. A 14. napra a laminin IR eloszlása a nervus vestibulocochlearis perifériás részében, annak belépési zónájában és a központi idegrendszerben is a nem operált állatokra jellemző képet mutatott.

A laminin eloszlásának változása a nervus vestibulocochlearisban és annak TZ-jában a molekula permisszív határása utal a perifériás idegrendszer regenerációja során. A központi idegrendszer fehérállományának azon részén, ahol megemelkedett a laminin expressziója, korábbi irodalmi adatok és a saját jelöléses vizsgálataink alapján is a regenerálódott tractus vestibularis rostjai haladnak. A laminin szerepe a központi idegrendszer regenerációja során még nem teljesen ismert. A laminin aktiválhatja a tPA/plasminogén rendszert, mely új szinaptikus kapcsolatok kialakulásához vezethet, és fontos szerepe lehet a LTP-k kialakulásában. A kétoldali expresszióváltozásért a laminin esetében is a commissuralis kapcsolatok tehetők felelőssé.

Összefoglalva elmondható, hogy az alacsonyabb rendű gerincesekben a központi idegrendszeri regeneráció valószínűleg azért lehetséges, mert a gátló molekulák a regeneráció idejére enzimatisz folyamatok révén eliminálódnak, mely folyamat az emlősökben limitált. A gátló faktorok lebontása az emlősökben kevésbé hatékonyan és sokkal lassabban történik. A regeneráció elmaradásának másik oka az lehet, hogy a myelinből keletkező törmelék is sokkal tovább van jelen emlősökben. Valószínűleg egyik ECM makromolekuláról sem mondható el, hogy minden esetben serkentő vagy gátló hatást fejt ki az axonnövekedésre, hanem hatásuk függ a mikrokoznyezettől illetve attól, hogy azon a sejten, amelyre hatnak milyen receptorok és extracelluláris mátrix ligandok találhatóak meg. E molekulák regenerációban betöltött szerepét elsősorban *in vitro* vizsgálatokból ismerjük, azonban az egyes molekulák kölcsönhatása teljesen megváltoztathatja szerepüket, ezért az *in vivo* modellek alkalmasabbnak látszanak a regenerációs vizsgálatokra.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Jelen munka első részében a vestibularis rendszer kapcsolatait vizsgáltuk fény- és elektronmikroszkópos neuronális jelölési módszerekkel patkányban. Neurobiotin jelölés segítségével feltérképeztük a nucleus vestibularis descendens (NVD) antero- és retrográd kapcsolatait a központi idegrendszer struktúráival, megerősítve és kiegészítve a korábbi adatokat. Elsőként mutattuk ki a NVD kapcsolatát a nucleus ruberrel. A rhombencephalonban leírtuk a NVD kapcsolatait az azonos- és az ellenoldali vestibularis magokkal, az érző agytörzsi magokkal és a formatio reticularissal. A gerincvelő mindhárom funiculussában kimutattuk a leszálló rostokat. Leírtuk a mag korábban nem ismert retrográd kapcsolatát a rhombencephalon képleteivel. Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) jelölés segítségével vizsgáltuk a nucleus vestibularis superior (NVS) szinaptikus kapcsolatait a nucleus n. oculomotorii-val és nucleus ruberrel. Az oculomotorius magban talált NVS eredetű, GABA pozitív terminálisok jelenléte alátámasztja a korábbi fiziológiai vizsgálatokban kimutatott gátló kapcsolatok jelenlétét. A nucleus ruber neuronjaival létesített hasonló kapcsolat azt jelenti, hogy a NVS a nucleus ruber neuronjainak gátlásával képes módosítani a cortico-rubralis és cerebello-rubralis útvonalak aktivitását.

A munka második részében az extracellularis matrix (ECM) makromolekuláinak és egyik receptorának megoszlását tanulmányoztuk béka idegrendszerében és vizsgáltuk szerepüket a vestibularis regenerációban. Specifikus próba segítségével a hyaluronsavat (HA), immunhisztokémiai módszerrel a phosphacant, valamint az ECM receptoraként ismert dystrophin-glycoprotein komplex alkotói közül a dystrophint és a β -dystroglycant elsőként mutattuk ki a béka idegrendszerében és leírtuk a tenascin, a fibronectin és a laminin eloszlását. A nervus vestibularis átvágását követő regeneráció során a HA mintázat kvalitatív és kvantitatív változásait ismertettük. Eredményeink szerint a perifériás idegrendszerben a HA permisszív hatású a regenerációra, amit a HA reakció intenzitásának növekedése jelez a regenerálódó idegben, valamint a perifériás és a központi idegrendszer átmeneténél lévő tranzicionális zónában (TZ). Ezzel szemben a központi idegrendszerben a HA non-permisszív hatása valószínű, amire a vestibularis magokban, az idegsejtek körüli un. perineuronal net (PN) területén a HA reakció intenzitásának csökkenése utal a regeneráció kezdetén, a benövő rostok kapcsolatainak kialakulását elősegítendő. A laminin immunreakció intenzitásának növekedése a vestibularis regeneráció során a perifériás idegrendszerben illetve a TZ-ban, és megjelenése a központi idegrendszerben a korábbi vizsgálatokban kimutatott permisszív szerepét igazolja az idegi regenerációban.

6. SUMMARY

In the first part of our work we investigated the connections of the vestibular system in the rat at light and electron microscopic levels with different tracing methods. Using neurobiotin, we mapped the antero- and retrograde connections of the descending vestibular nucleus (DVN) in the central nervous system (CNS), confirming and supplementing previous results. We have for the first time demonstrated a connection between the DVN and the red nucleus. At the level of the rhombencephalon we described the connections of the DVN with the ipsi- and contralateral vestibular nuclei, the sensory nuclei of the brainstem and the reticular formation. The descending axons of the DVN could be found in every funiculus of the spinal cord. We also demonstrated the previously unknown retrograde connections of the DVN with the rhombencephalic areas. Using the tracer, *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA-L), we investigated the synaptic connections of the superior vestibular nucleus (SVN) with the oculomotor and red nuclei. In the oculomotor nucleus, GABA positive axon terminals originating from the SVN support the presence of inhibitory connections described earlier in physiological experiments. Similar connections to the red nucleus suggest that neurons of the SVN can alter the activity of the cortico-rubral and cerebello-rubral pathways.

In the second part of our work we studied the distribution and role of the extracellular matrix (ECM) macromolecules in vestibular regeneration following vestibular nerve axotomy in the frog. We also analyzed the expression of ECM-receptor dystrophin-glycoprotein complex (DGC) subunits. We described for the first time in the nervous system of the frog the expression of hyaluronan (HA), using a specific binding-probe, and the distribution of phosphacan and DGC subunit dystrophin and beta-dystroglycan, using immunohistochemical methods. We gave a detailed map of the distribution of tenascin, fibronectin and laminin in the spinal cord and brainstem of the frog. We delineated the qualitative and quantitative changes in the expression of HA during vestibular regeneration. According to our results HA has a permissive role in the peripheral nervous system (PNS) and in the transitional zone (TZ) at the border between PNS and CNS during regeneration. The decreased expression of HA in the perineuronal net (PN) surrounding the vestibular neurons in the brainstem in the early phase of vestibular regeneration suggest that HA has a non-permissive role in the CNS, since the change in the distribution of HA can support the formation of new synaptic connections. We also showed an increased expression of laminin in the PNS, TZ and certain areas of the CNS during vestibular regeneration, indicating a permissive role of laminin as previously described.

7. KÖZLEMÉNYEK

A TÉZISEKET MEGALAPOZÓ IN EXTENSO KÖZLEMÉNYEK

1. Matesz C, Bácskai T, Nagy É, **Halasi G**, Kulik Á: Efferent connections of the vestibular nuclei in the rat: A comparative neuromorphological study. Brain Res Bull. 57: 313-315. 2002. **IF: 2.283**
2. **Halasi G**, Bácskai T, Matesz C: Connections of the superior vestibular nucleus with the oculomotor and red nuclei in the rat: An electron microscopic study. Brain Res Bull. 66:532-5. 2005 **IF: 2.283**

EGYÉB IN EXTENSO KÖZLEMÉNYEK:

1. Matesz C, Modis L, **Halasi G**, Szigeti ZM, Felszeghy S, Bacskai T, Szekely G: Extracellular matrix molecules and their possible roles in the regeneration of frog nervous system. Brain Res Bull. 66:526-31. 2005 **IF: 2.283**
2. Rác E, Bácskai T, **Halasi G**, Kovács E, Matesz C: Organization of dye-coupled cerebellar granule cells labeled from afferent vestibular and dorsal root fibers in the frog, *Rana esculenta*. Submitted to JCN.
3. Szigeti ZM, Matesz C, Szekely G, Felszeghy S, Bácskai T, **Halasi G**, Mészár Z, Modis L: Distribution of hyaluronic acid in the central nervous system of the frog. Submitted to JCN.
4. **Halasi G**, Bácskai T, Wolf E, Módis L, Székely G, Mészár Z, Szigeti ZM, Matesz C: Vestibular lesion-induced changes in the expression of the hyaluronan in the frog, *Rana esculenta*. In preparation Exp Brain Res.

Megjelent közlemények összesített impakt faktora: 6,849 Független idézetek száma: 4

A TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KONGRESSZUSI ABSZTRAKTOK:

1. Matesz C, **Halasi G**, Bácskai T: Antero- and retrograde connections of the descending vestibular nucleus in the rat. Magyar Idegtudományi Társaság Kongresszusa, Szeged, 2001. Neurobiology.9. 228-229.

2. Matesz C, Bácskai T, Nagy É, **Halasi G**, Kulik A: Anterograde connections of the vestibular nuclei in the rat: A comparative neuromorphological study. 3rd European Conference on Comparative Neurobiology, Murcia, Spanyolország, 2001.
3. Bácskai T, **Halasi G**, Matesz C: Comparative study on the afferent connections of the lateral vestibular nucleus in the frog and rat. Magyar Idegtudományi Társaság Kongresszusa, Budapest, 2002. *Clinical Neurosci.* 56:2.6.
4. Bácskai T, **Halasi G**, Matesz C: Electronmicroscopical studies on the mesencephalic termination areas of the rat vestibular nuclei. Magyar Idegtudományi Társaság Kongresszusa, Balatonfüred, 2003. *Clinical Neurosci.* 56:2.
5. Matesz C, Módis L, Szigeti ZM, Felszeghy S, Bácskai T, **Halasi G**, Székely G: Extracellular matrix molecules in the nervous system of the frog. Magyar Idegtudományi Társaság Kongresszusa, Balatonfüred, 2003. *Clinical Neurosci.* 56:2 57.
6. Szigeti ZM, Módis L, Matesz C, Felszeghy S, Bácskai T, **Halasi G**, Székely G: Hyaluronan distribution pattern in the nervous system of the frog. Magyar Idegtudományi Társaság Kongresszusa, Balatonfüred, 2003. *Clinical Neurosci.* 56:2 86-87.
7. **Halasi G**, Bácskai T, Módis L, Székely G, Matesz C: Vestibular lesion-induced changes in the expression of the extracellular matrix molecules in the frog. IBRO International Workshop, Budapest, 2004. *Clinical Neurosci.* 57: 1. 22.
8. Szigeti ZM, Matesz C, Bácskai T, **Halasi G**, Székely G, Módis L: Distribution of tenascin-C and fibronectin in the nervous system of the frog. IBRO International Workshop, Budapest, 2004. *Clinical Neurosci.* 57: 1. 65.
9. **Halasi G**, Bácskai T, Matesz C: Connections between the superior vestibular nucleus and the oculomotorius and red of the rat: An electronmicroscopical study. 4th European Conference on Comparative Neurobiology: Evolutionary Development Biology of Brains, Congress Book of 4th ECCN. Oxford. 2004.
10. Matesz C, Módis L, **Halasi G**, Szigeti ZM, Felszeghy S, Bácskai T, Székely G: Extracellular matrix molecules and their possible role in the regeneration of frog nervous system. Congress Book of 4th ECCN. Oxford. 2004.

11. **Halasi G**, Matesz C, Jancsik V: Expression of dystrophin-glycoprotein complex in the nervous system of the frog. Magyar Idegtudományi Társaság Kongresszusa, Pécs, 2005. Clinical Neurosci. In press.

EGYÉB KONGRESSZUSI ABSZTRAKTOK:

1. Bácskai T, **Halasi G**, Matesz C: Synaptic connections on the hypoglossal nucleus of the frog. IBRO International Workshop, 2004. Budapest. Clinical Neurosci. 57:1. 4.
2. Bácskai T, Veress G, **Halasi G**, Matesz C: Involvement of the vestibular system in the prey catching behavior of the frog. Magyar Idegtudományi Társaság Kongresszusa, 2005. Pécs. Clinical Neurosci. In press.
3. Rácz E, Bácskai T, **Halasi G**, Matesz C: Dye-coupled connections of the primary afferent vestibular fibers in the cerebellum of the frog. 1st International Conference on Basic and Clinical Immunogenomics, Budapest, 2004. Tissue Antigens 64: 317-441.
4. Rácz E, Kovács E, Bácskai T, **Halasi G**, Matesz C: Dye-coupled connections of the primary afferent fibers in the cerebellum of the frog. Magyar Idegtudományi Társaság Kongresszusa, 2005. Pécs. Clinical Neurosci. In press.