

EGYETEMI DOKTORI (Ph. D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

MÁTHÉNÉ SZIGETI ZSUZSA



TÉMAVEZETŐK: DR. MÓDIS LÁSZLÓ, DR. MATESZ KLÁRA

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
ANATÓMIAI, SZÖVET ÉS FEJLŐDÉSTANI INTÉZET**

Debrecen, 2006

A témavezetők a DE OEC 10. Doktori Programjának („Fogorvostudományi Kutatások”) akkreditált oktatói, az egyik témavezető (Matesz Klára) a Fogorvostudományi Karhoz tartozó Fogorvos Anatómiai tanszék tanszékvezetője, a másik témavezető (Módis László) a 10. Doktori Program vezetője. A szerző és a témavezetők munkahelye az ÁOK Anatómiai Intézete.

BEVEZETÉS

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

Az emlősökkel szemben a halak, kétélűek és hüllők esetében az idegrendszer különböző területén írtak le regenerációt. A nervus opticus átvágása után a retina axonjai benőnek a látóközpontokba, és az állat látása funkcionális vizsgálatok eredményei szerint visszatér. A nervus vestibulocochlearis sérülése után kialakult egyensúly- és hallászavarok bizonyos idő után megszűnnek, és a regeneráció szövettanilag is kimutatható. Az átvágott és újraegyesített gerincvelői dorsalis gyökér képes benőni a gerincvelőbe, ahol a terminálisok funkcionális kapcsolatot alakítanak ki. Mindezek az adatok arra utalnak, hogy az alacsonyabbrendű gerincesek esetében a regenerálódó axon mikrokörnyezete eltér az emlősökben található non-permisszív környezettől.

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

Az ECM makromolekuláinak az idegi regenerációban betöltött szerepére alkalmas *in vivo* modell a béka látórendszere. A regeneráció időbeli lefolyása, fiziológiai, magatartási és neuronális jelölési vizsgálatok alapján jól ismert, ezért az ECM expressziójának esetleges változása korrelációba hozható a regeneráció lefolyásával.

CÉLKITŰZÉSEK

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

A fentieknek megfelelően az alábbi célokat fogalmaztuk meg:

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

Ilyen vizsgálati eredményeket nem találtunk a szakirodalomban.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgálatainkban felnőtt kecskebékát használtunk (*Rana esculenta*), kísérleteinket a DEMÁB (Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság) engedélyével végeztük (Eng. Sz.:22/2001.). A hyaluronsav (HA), a tenascin és a fibronectin kimutatásához három állatból származó metszeteket, a regenerációs kísérletekhez 42 békát használtunk fel. Az állatokat 0,1 %-os MS-222 (3-aminobenzoészav etil észter, Sigma, St. Louis, MO) felhasználásával elaltattuk és transcardialisan izotóniás sóoldattal perfundáltuk 2-3 percig. A teljes központi idegrendszert izoláltuk és a telencephalont, a diencephalont, az agytörzset a hozzájuk kapcsolódó agyidegekkel, a gerincvelőt a mellső és a hátsó gyökérrel külön-külön Sainte-Marie fixálóba (99 % abszolút alkohol, 1 % koncentrált ecetsav) helyeztük egy éjszakára. A blokkokat paraffinba ágyaztuk be és Reichert microtommal 10 µm vastagságú metszeteket készítettünk.

A hyaluronsav kimutatása

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

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

A tenascin-C kimutatása

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

A fibronectin kimutatása

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

Semikvantitatív és kvantitatív analízis

Először camera lucida segítségével a megfelelő keresztmetszetekbe berajzoltuk a béka agyának és gerincvelőjének pozitív HA, tenascin-C és fibronectin reakciót adó területeit. Ennek alapján sematikus rajzokon öt intenzitási fokozattal ábrázoltuk a HA, a tenascin C és a fibronectin reakció eloszlási mintázatát.

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

Nervus opticus regenerációs vizsgálatok

A békákat a fentiekben leírt módon elaltattuk és a szájpadi nyálkahártyát felnyitottuk. A nervus opticust takaró szemmozgató izmok lepreparálását követően a látóideget a szemhez közeli részen átvágtuk, majd a műtét után a nyálkahártyát összeragasztottuk. A 42 béka a műtét után 3, 5 napig, illetve 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 és 12 hétig túlélte. A túlélési idő letelte után a békákat újra elaltattuk és transcardialisan izotóniás sóoldattal perfundáltuk 2-3 percig. A telencephalont, a diencephalont, az agytörzset a hozzájuk kapcsolódó agyidegekkel külön-külön Sainte-Marie fixálóba helyeztük egy éjszakára. A blokkokat paraffinba ágyasztuk és Reichert microtommal $10\ \mu\text{m}$ vastagságú metszeteket készítettünk. A metszeteken HA próbát és tenascin-C immunreakciót végeztük el, majd a metszetekről felvételeket készítettünk a Nikon Eclipse 800 mikroszkóppal SPOT RT digitális kamerával. A nervus opticus végződési területein a kvantitatív analízisnél leírt módon megmértük a HA és a tenascin-C reakció optikai denzitását a különböző túlélési stádiumokban.

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

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

A HA megoszlása a béka központi idegrendszerében

A HA pozitív területek a telencephalontól a gerincvelő caudalis részéig megfigyelhető. A telencephalonban a legerősebb reakciót, az amygdala pars medialis és az area preoptica, a bulbus olfactoriusban a stratum granulosum internuma és a stratum mitrale mutatta. Ehhez hasonlóan intenzíven festődött a diencephalonban a nucleus Bellonci (nB), a nervus opticus, a chiasma opticum és a tractus opticus, a mesencephalonban a tectum opticum B, D, F, 5. és 3. rétegei, a nucleus opticus basalis (BON), a nucleus isthmi széli része és a belső régió neuropilje és a szemmozgató agyidegi magok körüli perineuronális háló (perineuronal net, PN). A cerebellumban a Purkinje sejtek rétege, a rhombencephalonban a nucleus cochlearis, nucleus vestibularis lateralisban a PN és a motoros és érző agyidegek átmeneti zónája mutatott hasonlóan intenzív reakciót. A gerincvelőben a motoneuronok körüli PN és a radix dorsalis átmeneti zónája mutatott intenzív festődést. Kevésbé intenzíven festődött a diencephalonban a corpus geniculatum laterale (CGL) perikaryonja körül a PN, a mesencephalonban a tectum opticum G, E, C, 6., 7. és 8. rétegei, a cerebellumban a stratum moleculare és a stratum granulare, a rhombencephalonban a formatio reticularis medialis és median zónája és a gerincvelőben a radix ventralis átmeneti zónája. Halványan festődött a tectum opticum A, 1., 2. és 4. rétege, valamint az agyidegek és gerincvelői gyökök perifériás része.

A látóközpontban elvégzett optikai denzitás mérés azt mutatta, hogy a normál béka esetében a diencephalonban a HA reakció optikai denzitása a nucleus Bellonciban volt a legnagyobb. Az optikai denzitás értéke az area preopticában és a CGL-ban erősebb volt, mint a nucleus preopticus magnocellularisban. A mesencephalonban a tectum opticum rétegei közül a legmagasabb denzitás a B rétegben, míg a legalacsonyabb az A, 1., 2. és 4. rétegekben volt detektálható.

Korábbi vizsgálatokkal összehasonlítva az idegrendszer különböző részeiben bizonyos fokú átfedés figyelhető meg a béka, a patkány és az emberi agy HA mintázatában a vestibularis rendszerben és formatio reticularis magjaiban. A hasonlóság mellett néhány különbség is megfigyelhető: a béka tectum opticum HA-ban gazdag, ezzel szemben a patkány és az ember colliculus superiorja, ami a béka tectum opticummal homológ képlet, nem mutatott pozitív reakciót. Ezt a különbséget jelenleg nem tudjuk megmagyarázni, valószínűleg összefüggésben lehet azzal, hogy a látóideg emlősökben nem regenerálódik.

A HA a szürkeállományban elsősorban a perineuronális háló egyik fő elemeként mutatható ki. Irodalmi adatok alapján a HA molekula legalább kétféle kölcsönhatásban vesz részt a perineuronális háló területén. Az egyik lehetőség, hogy a HA a sejtek HA-receptoraihoz így a CD44-hez és a RHAMM-hoz kapcsolódik, míg a másik pedig, hogy a HA molekulák számos lektikán családba tartozó proteoglikánhoz kapcsolódnak. Miután a HA receptorait és a szóba jöhető PG-ok előfordulását békában még nem vizsgálták, így jelenleg nem tudunk nyilatkozni arról, hogy a két csoport közül mindegyik részt vesz-e a kötődésben.

A tenascin-C megoszlása a béka központi idegrendszerében

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

A mi eredményeinkkel szemben felnőtt egérben és csirkében mások azt tapasztalták, hogy a tenascin-C expressziója alacsony a központi idegrendszerben és az idegrendszernek csak azon területein expresszálódik, ahol nagyfokú az idegi plaszticitás.

A fibronectin eloszlása béka központi idegrendszerében

Vizsgálatainkban a fibronectin reakció a béka agy és a gerincvelő szürke- és fehérállományában több helyen pozitív volt. A szürkeállományban a neuropil és a neuronok cytoplazmája festődött, a PN nem. A telencephalonban a legintenzívebben festődött a bulbus olfactorius accessorius, a commissura anterior és pallii, a diencephalonban pedig a nervus opticus, a chiasma opticum és a tractus opticus. A mesencephalonban a nucleus isthmi, a cerebellumban a Purkinje sejtek, a rhombencephalonban a nervus trigeminus motoneuronjainak cytoplazmája, a motoros és érző agyidegek átmeneti zónája, a gerincvelőben a commissura anterior, a motoneuronok cytoplazmája mutatott intenzív fibronectin IR. Halványan festődött a mesencephalonban a nucleus opticus basalis.

Az agyidegek és a gerincvelői gyökök perifériás része erősen pozitív volt. A fibronectin egyenlőtlen eloszlásának okát a központi idegrendszerben a fehérállományban nem ismerjük. Egyik magyarázat lehet a fibronectint termelő gliasejtek egyenlőtlen eloszlása a fehérállományban.

Irodalmi adatok szerint a fibronectint a glia termeli, ezzel szemben saját vizsgálatainkban a fibronectint a neuronok cytoplazmájában mutattuk ki. Ennek okát jelenleg nem ismerjük. Lehetséges, hogy békában nem csak gliasejtek, hanem neuronok is képesek lehetnek a fibronectin termelésére. Ennek eldöntésére a mRNS *in situ* hibridizációval történő kimutatása szükséges.

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

Vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a HA, tenascin-C és a fibronectin egyenlőtlen eloszlást mutat a béka központi idegrendszerében. Hasonló vizsgálatok korábban a béka és más alacsonyabbrendű gerinces idegrendszerében nem történtek és magasabbrendű gerincesekben is nagyon kevés adat áll rendelkezésre az ECM makromolekulák központi idegrendszeri eloszlási mintázatáról. Mindhárom molekulát kimutattuk a szürke- és fehérállomány területén, de egyik esetben sem találtunk olyan megoszlást, amely kizárólagosan köthető lenne valamilyen specifikus struktúrához. A szürkeállományban a

legfontosabb különbség az volt, hogy a tenascin-C-t és a HA-t a perikaryon körüli PN-ban és a dendritekben találtuk meg, míg a fibronektint a neuron cytoplazmájában. A neuropilben mindhárom reakció esetében pozitív volt. A HA és a tenascin- C eloszlásban tapasztalható hasonlóságok egyik oka az lehet, hogy a PN-ben a HA tenascinhoz kötve fordul elő. Az egyes agyterületeken mutatkozott legjelentősebb hasonlóságok és különbségek a következőkben foglaltuk össze.

Telencephalon

A bulbus olfactorius accessorius erősen festődött fibronektinre, míg a másik két esetben jóval gyengébb volt. Az area preoptica nagysejtes régiója pozitív HA reakciót mutatott, a sejtestek és a proximalis dendritek körül jól látható volt a PN, a tenascin-C és a fibronektin esetében ez a terület gyengén festődött.

A palliumban csak a HA esetében volt látható erős festődés, a tenascin-C és a fibronektin IR gyenge festődést mutatott. Tenascin-C reakciónál csak a commissura anterior, míg a fibronektin reakciónál a commissura pallii is festődött. A lateralis előagyi kötegben mindhárom reakciónál halvány festődést tapasztaltunk.

Diencephalon

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

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

Mesencephalon

A tectum opticumban a HA és a tenascin-C reakció intenzitásának erőssége több helyen átfedést mutatott. Intenzív HA reakció volt látható a B, D, F, 5. és 3. rétegben, gyengébb reakciót tapasztaltunk a G, C, E, 8., 7. és 6. rétegekben, míg nagyon gyenge reakciót az A, 1., 2. és 4. rétegekben. Az F és 8. rétegben jól felismerhető volt az intenzíven festődő perineuronális háló. A tenascin-C immunhisztokémiai reakció a G, F, 8. és a 7. rétegekben volt erősebb, gyengébb reakciót tapasztaltunk az 5., 6., B, C, D és E rétegekben, míg nagyon gyenge volt a reakció az A, 1., 2., 3. és 4. rétegekben. A PN jól látható volt a 7.

és F rétegekben. Az előbb felsorolt rétegek közül a kontralateralis opticus rostok végződési területén mindkét reakció erősebb volt az F és G rétegekben, míg a B és D rétegekben a HA volt jóval intenzívebb. Ezen belül az F rétegben jól látható volt a PN. A primer afferensek opticus rostokat fogadó tectalis rétegekben észlelt intenzív HA és tenascin-C reakció arra utalhat, hogy ezeknek a molekuláknak fontos szerepe lehet a nervus opticus regenerációja során fellépő plasztikus változásokban. Azok közül a rétegek közül, amelyek nem fogadnak primer afferens opticus rostokat, mind a tenascin-C, mind a HA reakció intenzív volt a 7. és 8. rétegben és a PN is jól felismerhető volt. A két réteg közül a 8. réteg a nucleus isthmivel van kapcsolatban. Feltételezhető, hogy a nervus opticus átvágása után az isthmotectalis kapcsolatok működése is megváltozik, és a változáshoz vezető jelátviteli folyamatokban fontos lehet a tenascin-C és a HA szerepe. A tectum opticum rétegeiben a fibronectin reakciónál nem tapasztaltunk jelentős eltérést az egyes rétegek festődésében.

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

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

Cerebellum

Mindhárom molekula kimutatható volt a kisagy valamennyi rétegében, eltérő intenzitással.

Rhombencephalon

A HA és a tenascin-C esetében minden motoros agyidegi mag erős reakciót mutatott, ami a motoneuronok körüli perineuronális háló fejlődésének köszönhető. Ez a festődés azonban nem olyan intenzív, mint a mesencephalonban található szemmozgató agyidegi magvakban. Az érző agyidegek magjai, mint a nucleus cochlearis és a nucleus

vestibularis lateralis (Deiters mag) neuronjai körül is pozitív HA és tenascin-C reakciót figyeltünk meg. A fibronektinnél a motoneuronok cytoplazmájában volt pozitív a reakció.

A formatio reticularis különböző részei változó intenzitást mutattak a három reakció esetében, a nagy sejtek körül nagyon intenzíven festődött a perineuronális háló. Az oliva superiorban pozitív reakció volt látható mindhárom esetben. A rhombencephalon fehérállománya mindhárom reakció esetében területenként változó intenzitással festődött.

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

Gerincvelő

Mindegyik reakciót detektáltuk a gerincvelő szürke- és fehérállományában. A mellső szarvban nagyon intenzíven festődő perineuronális háló volt látható a motoneuronok körül a HA és a tenascin-C reakciónál, míg a fibronektin esetében a motoneuronok cytoplazmája mutatott pozitívítást. A commissura anterior rostjai erősen festődtek HA és tenascin-C reakcióval. A fehérállományban a legerősebb reakciót a funiculus lateralis subpialis területén láhattuk. A radix dorsalis átmeneti zónája nagyon intenzíven festődött mindhárom reakciónál, míg a radix ventralis átmeneti zónájában kisebb intenzitású reakciót tapasztaltunk. Maga a radix ventralis és dorsalis nagyon gyenge HA és tenascin-C reakciót mutatott és erősen festődött fibronektinre.

Nervus opticus regenerációs vizsgálatok

A HA reakció változása a béka látóközpontjaiban regeneráció során

Diencephalon.

Általánosságban elmondható, hogy az ötödik túlélési naptól kezdve mindkét oldali nB-ban és CGL-ban csökkent a HA intenzitása. A harmadik posztoperatív hétig mindkét magban kisebb mértékű volt a csökkenés az ép nervus opticus rostjait fogadó oldalon. A harmadik héttől kezdve nőtt az optikai denzitás mindkét oldalon, és ez a növekedés nagyobb mértékű volt a regenerálódó rostokat fogadó oldalon. Valamennyi vizsgált stádiumban a nB területén a reakció intenzitása kisebb mértékben változott, mint a CGL-ban, ez a különbség mindkét oldalon megfigyelhető volt.

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

és a HA reakció csökkenése fontos lehet az új szinaptikus kapcsolatok kialakulása szempontjából, amely kapcsolatokat a reintegrálódó PN stabilizálhat. A PN-nak a corpus geniculatum lateraleban tapasztalt dezintegráltsága a második-ötödik hét között volt megfigyelhető az operált oldalon, ami megfelel annak az időnek, amikor a regenerálódó nervus opticus rostok elérték a diencephalon.

Mesencephalon.

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

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

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a béka nervus opticusának regenerációja során a regenerálódó rostok milyen sorrendben és mennyi idő alatt érik el a diencephalonban és a mesencephalonban megtalálható targetjeiket. A tectum opticumban és a BON-ban tapasztalt reakció intenzitás csökkenés az ötödik-nyolcadik hétre tehető, ez egybe esik a Stelzner és munkatársai megfigyeléseivel, hogy a regenerálódó opticus rostok a nyolcadik hétre elérik mesencephalicus központjaikat. Kimutattuk, hogy azokban a rétegekben jóval erősebb a HA reakció intenzitása, ahol a primer afferens opticus rostok végződnek. A HA szerepe az idegi regenerációban még nem pontosan ismert, serkentő szerepét írták le patkány környéki idegrendszerében, más szerzők gátló szerepét írták le a sejt migráció és a rost növekedés során a központi idegrendszerben. Hatását befolyásolhatja molekulatömege, továbbá a hozzá kapcsolódó proteoglikánok és sejtfelszíni receptorai révén különböző jelátviteli folyamatokban vehet részt, melyek tovább módosíthatják permisszív vagy non-permisszív szerepét.

A tenascin-C reakció változása a béka látóközpontjaiban regeneráció során

Diencephalon.

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

Mesencephalon.

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

A második hétre lecsökkent a tenascin-C IR. Mindkét oldalon halványabban festődött minden réteg, mint a kontroll békánál, és ezt mutatta az optikai denzitás mérése is. A harmadik-hatodik túlélési héten mindkét oldalon intenzívebb festődést tapasztaltunk minden rétegben, mint a kontroll béka esetében. A perineuronális háló csak a hatodik héten volt jól látható a 7. és a F rétegekben. Az optikai denzitás maximumát a harmadik-hatodik túlélési hét között érte el, utána mindkét oldalon csökkent, majd a minimumát a nyolcadik-kilencedik hét között érte el. A tizenkettedik hétre a tenascin-C reakció optikai denzitása megközelítette a normál állatban mért értékeket mindkét oldalon. A BON-ban a HA reakciónál leírt változások figyelhetők meg, de a változás kisebb mértékű volt.

A tenascin-C és a HA reakció változását összehasonlítva elmondhatjuk, hogy a második-harmadik túlélési héten a PN dezintegráltsága a CGL-ben mindkét reakciónál megfigyelhető. A tectum opticumban mindkét reakció esetében kisebb mértékű volt a változás, mint a diencephalon látóközpontjaiban.

Irodalmi adatok szerint a tenascin-C fontos szerepet játszik a központi és környéki idegrendszerben bekövetkezett sérülések utáni idegregenerációban, azonban pontos szerepe még nem tisztázott. Expressziós mintázatának változása a nervus opticus regenerációja során más béka fajban hasonló a mi eredményeinkhez, míg a gőtében ellenkező előjelű változást találtak. Az irodalmi adatok abban megegyeznek, hogy a kétélűekben a

magasabbrendű gerincesekkel szemben fejlődés során nem csökken az agy különböző területein a tenascin-C reakció intenzitása. Ez a pedomorfizmus lehet az egyik lehetséges magyarázata annak, hogy a kétélűekben a nervus opticus regenerálódik.

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

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

Az ECM-nek az idegrendszerben betöltött szerepéről egyre inkább körvonalazódik az a hipotézis, az ECM makromolekulái a szinaptikus részben egy jelátviteli komplex kialakításában vesznek részt. Ebben a komplexben az ECM makromolekulái a pre- és postszinaptikus membránban található receptoraikhoz, CAM-okhoz, ioncsatornákhöz, neurotransmitter receptorokhoz, valamint a receptor tirozin kinázhoz (TRK) kötődnek, és ezáltal alkalmasak lehetnek a pre- és postszinaptikus történések koordinálására. A jelátviteli komplex a cytoskeleton közvetítésével befolyásolhatja a neurotransmitter release-t, a génexpresszió megváltoztatásán keresztül pedig módosíthatja a különböző sejtfunkciókat. Mindezen folyamatok eredőjeként az ECM különböző makromolekulái permisszív vagy non-permisszív szerepet játszhatnak az idegi regenerációban és plaszticitásában. Az idegi sérüléskor a sejtek deafferentálódása a jelátviteli komplex megváltozását vonhatja maga után, ami olyan intracelluláris folyamatokat indíthat el, aminek következtében megváltozik a neuronokat körülvevő ECM összetétele. A különböző életkorban és fajokban megfigyelhető regenerációs potenciál hátterében az ECM eltérő eloszlása állhat.

ÖSSZEFOGLALÁS, EREDMÉNYEK JELENTŐSÉGE

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

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

KÖZLEMÉNYEK

A téziseket megalapozó in extenso közlemények:

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

További in extenso közlemények:

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

KONGRESSZUSI ABSZTRAKTOK

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

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

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