

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

Biológus MSc szak

DIPLOMAMUNKA

**Funkcionálisan működőképes motoros mintázathoz
szükséges minimális újraidegző motoneuronszám
meghatározása a patkány hátsó végtagban**

Török Dénes György

Témavezető: Dr. Nógrádi Antal

MTA Doktora, egyetemi docens

SZTE ÁOK Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

Neuroregenerációs Laboratórium

Konzulens: Dr. Toldi József

tanszékvezető egyetemi tanár

SZTE TTIK Élettani, Szervezettani és

Idegtudományi Tanszék

2014

Összefoglalás

A gerincvelőt érintő sérülések egyik gyakori esete egy vagy több mellső gyökér kiszakadása, amely során fizikai hatásra a motoneuronok axonja és a sejttestek közti kontinuitás megszakad. Terápiás beavatkozás nélkül az érintett mozgató idegsejtek többsége rövid időn belül elpusztul, amely a szegmens által beidegzett izmok teljes bénulásához vezet. Korábbi kísérleteinkből ismert, hogy a riluzole neuroprotektív szer alkalmazásával nagymértékű motoros idegsejt túlélés érhető el, és a megmentett motoneuronok jelentős része új axont növeszt, amely reinnerválhatja a denervált végtagizmokat. Jelen tanulmányunkban L4-L5 avulzió és L4 reimplantáció átesett Sprague Dawley patkányok eltérő koncentrációban kaptak riluzole-t. Ezúttal arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a reinnerváló motoneuronok kis számbeli eltérése okoz-e különbséget a funkcionális reinnervációban, illetve mennyire vizsgálható ez a különbség kinematikus analízis segítségével. Mivel az irodalomban fellelhető tesztrendszerek segítségével nem lehetséges a regeneráció nagy felbontású vizsgálata, elsőként egy új összetett, érzékeny tesztrendszer felállítása volt célunk. A funkcionális vizsgálat során az állatok egy speciális futópádon haladtak végig, a hátsó végtag mozgását pedig videofelvételek elemzésével vizsgáltuk számos paramétert figyelembe véve. A tesztelési időszakot követően az L4-es gerincvelői szegmentum reinnerváló sejtjeinek retrográd fluoreszcens jelölésére és számolására került sor. Tesztrendszerünk segítségével lehetővé vált az eltérő dózisú riluzole kezelések közti funkcionális különbség kimutatására, és a mért értékek korreláltak a sejtszámolás eredményeivel. A csoportok elemszámának növelésével végső célunk meghatározni, hogy minimálisan hány motoros idegsejt szükséges a végtag kielégítő (a humán esetekben alkalmazott izomerő skála 4-es értékével egyenrangú) reinnervációjához, így a későbbiekben növelhetjük a humán gerincvelő sérülésterápiainak hatékonyságát.

Kulcsszavak: gerincvelő, avulzió, motoneuron regeneráció, riluzole

Tartalomjegyzék

Összefoglalás	2
Bevezető	5
Gerincvelő sérülések	5
Kísérleti paradigmák a lumbalis gerincvelői sérülések vizsgálatára	7
Célkitűzések	12
Anyagok és módszerek	13
Műtési beavatkozások.....	13
Riluzole-kezelés	14
Funkcionális tesztek	14
Szövetteni eljárások	19
Eredmények	21
A funkcionális tesztek eredményei.....	21
Morfológiai eredmények.....	27
Diskusszió	28
Irodalomjegyzék	30
Köszönetnyilvánítás	34
Nyilatkozat	35

Bevezető

Gerincvelő sérülések

A világon évente átlagosan több tízezer embert ér gerincvelő sérüléssel járó baleset. Első hallásra talán nem tűnik magasnak ez a szám, a társadalmi hatás mégis igen jelentős: a sérültek többségükben (82%) 16-30 éves férfiak, akik amellet, hogy a szerencsétlenség következtében nagy valószínűséggel munkaképtelenné válnak, hatékony terápia híján a balesetet követően egész életükben orvosi felügyeletet és ellátást igényelnek (Coura és mtsai 2013).

A sérülések csoportosítása több szempont alapján történhet. Különböző tünet együttest tapasztalhatunk attól függően, hogy a gerincvelő mely szakasza érintett: a cervicalis szakasz súlyos sérülése a négy végtag és a törzsizomzat teljes bénulásával járhat, ezt nevezzük tetraplégának. Ez az összes eset 45%-át teszi ki (Hasler és mtsai 2011). Amennyiben a thoracalis, vagy lumbalis gerincvelő roncsolódik paraplégiáról beszélhetünk, amely az alsó végtagok és a törzsizomzat bénulását okozza (Middleton és mtsai 2012). Csoportosíthatunk a gerincvelő keresztmetszetének érintettsége alapján is, így részleges, vagy teljes gerincvelő sérülésről beszélhetünk. Utóbbi esetben a sérüléstől caudálisan a neurológiai funkciók teljes hiánya lép fel. A behatás típusa szerint a következő sérülések különböztethetők meg:

-**zúzódásos sérülések:** ezekre általában léziók és ciszták jellemzők, amelyek nekrotikus és apoptotikus folyamatok során jönnek létre. Általában sport-, és közlekedési balesetek okozzák. (Young 2002).

-**átmetszések:** A felszálló és leszálló pályák retrográd és anterográd degenerációja figyelhető meg az érintettség függvényében, ezek szúrássok, vágások következményei. Az átmetszések másodlagos következménye az oligodendrociták pusztulása miatt bekövetkező demielinizáció, amely a pályák további pusztulását okozza (Carlstedt 2008).

-**avulzió:** szintén közlekedési balesetek gyakori következménye. A gerincvelői mellső gyökér nagy erőhatás következtében kiszakad, így a motoneuronok sejtteste és az axon proximális szakasza közötti kontinuitás megszűnik. Ennek következtében egyrészt az axonális transzport leáll, és az idegrostok lassú, úgynevezett Waller-

degenerációja megy végbe (Coleman és Freeman 2010), másrészt a motoros idegsejtek túlyomó többsége rövid időn belül elpusztul: patkánykísérletekben tapasztaltak szerint a cervicalis 7-es szegmentumban 5 hét elteltével beavatkozás hiányában csupán 7 százalékos túlélés tapasztalható (Pintér és mtsai, 2010). A pusztulás egyik legfőbb oka a glutamát okozta excitotoxicitás (Choi 1992). A sérült szövetekben felhalmozódó glutamát a posztszinaptikus AMPA és NMDA receptorok folyamatos permeabilitását okozza, a túlzott mértékű serkentő hatások pedig rövid időn belül sejthalálhoz vezetnek (Doble 1996). A motoros idegsejtek degenerációjának mértékét a mikrogliamediált gyulladásos folyamatok tovább fokozzák.

A sérült sejtekben védőmechanizmusok is érvényre jutnak: a motoneuronok szómája és dendritjei összezsugorodnak, így csökken a glutamát támadási felülete (Linda és mtsai, 1985), ezen kívül az axon növekedéséért felelős faktorok (pl. BDNF), ezek receptorai (Piehl és mtsai 1998), és egyéb regenerációt segítő fehérjék (pl.: GAP-43) képződése kezdődik meg (Olsson és mtsai 2000). A sérült motoneuron túlélés esetén tehát új axont is növeszthet. A túlélés és regeneráció azonban neuroprotektív anyagokkal segíthető. Ilyen, összetett hatású anyag a riluzole (2-amino-6-trifluorometoxibenzotiazol), amely a feszültségfüggő Na^+ és Ca^{++} ioncsatornák blokkolásán keresztül gátolja a glutamát preszinaptikus felszabadulását (Doble 1996, Duprat és mtsai 2000, Yongchao és mtsai 2013). Ezen tulajdonságai miatt a szer a központi idegrendszer traumás és iszkémiás károsodásainak kezelésére is alkalmas, hiszen csökkenti a glutamát-excitotoxicitást, így elősegíti a neuronális túlélést. A riluzole a klinikumban jelenleg is használatos, de eddig csak neurodegeneratív betegségek esetében alkalmazták, és a terápia csak amyotrophias lateralis sclerosis esetében bizonyult sikeresnek (Bensimon és mtsai 1994).

Laboratóriumunk korábbi kísérletei szerint a motoneuronok túlélése az avulziót követően a kihúzott C7 vagy L4 ventrális gyökér azonnali visszaültetésével elősegíthető, és a visszaültetett gyökérben futó axonok retrográd jelölésével azt is sikerült bebizonyítani, hogy a túlélő motoros idegsejtek egy része új axon növesztésére képes (Nógrádi és Vrbová 2001, Pintér és mtsai 2010). Korábbi kutatásaink arra is rámutattak, hogy a visszaültetéssel egy időben megkezdett riluzole-kezelés hatására a C7 gerincvelői szegmentumban a motoneuronok túlnyomó

többsége (76%) túlél és ezek 86%-a reinnervál, ez pedig a funkcionális működés visszatérésében nyilvánul meg (Nógrádi és Vrbová 1996, 2001, Nógrádi és mtsai 2007).

Kísérleti paradigmák a lumbalis gerincvelői sérülések vizsgálatára

Parciális denerváció

Újszülött rágcsálókban megfigyelték a polineuronális innerváció jelenségét, ez azt jelenti, hogy a motoros egység egyedfejlődésének korai fázisában egy motoneuron nagyszámú izomrostot beidegezhet és egy izomrost több motoneurontól kaphat rostokat (Ribchester és Barry, 1994). Ezek a kapcsolatok nagy része azonban a posztnatális 18. napra visszafejlődik, egy motoros idegsejt jellemzően egy funkciót ellátó izomrostcsoport (100-1000 izomrost) beidegzésére képes és nincs átfedés a motoros idegsejtek territóriumai között (Feud és mtsai 2000). Kísérletek bebizonyították, hogy ha α -bungarotoxinnal gátoljuk a preszinaptikus acetilkolin felszabadulást az előbbiekhöz hasonló neuromuszkuláris szinapszis pusztulást okoz. (Connold és Vrbová 1991). A motoros véglemezek visszahúzódásának magyarázta tehát az szinaptikus kapcsolatok eltérő mértékű használata, és az is ismert, hogy ideg és az izomrost közötti kommunikációban a preszinaptikus L-típusú Ca^{++} ioncsatornák játsszák a kulcsszerepet (White és Vrbová 1998). Az ideg-izom kapcsolatok megváltozó kihasználtsága a motoneuronok differenciálódásával magyarázható. Rágcsálókísérletekben bebizonyították, hogy az egyedfejlődés kezdeti szakaszában tapasztalt egységes, rövid periódusú, alacsony amplitúdójú tüzelési mintázatok idővel eltérést mutatnak, így a kifejlett izomrostok fiziológiás tulajdonságaikban is különbözővé válnak. Létrejönnek lassú, nem fáradékony, gyors, nem fáradékony és gyors fáradékony izomrostok (Slawinska és mtsai 1996). Az okozati összefüggés klasszikus bizonyítása a keresztezett reinnerváció kísérlete, melyben megcserélték az izmokat beidegző idegeket, így azok élettani tulajdonságai megváltoztak (Buller és mtsai 1969). Mára ennek a jelenségnek a molekuláris biológiai hátterét is ismerjük (Bergersen és mtsai 2006, Zaheer és mtsai 2009).

A hátsó végtag kulcsfontosságú, hosszú idő óta vizsgált izmai a soleus (SOL), az extensor digitorum longus (EDL), valamint tibialis anterior (TA) (ábra). Ezek az izmok élettani tulajdonságaikban, a felépítő rostok arányaiban, valamint a beidegző gerincvelői szegmentumok megoszlásának tekintetében is eltérést mutatnak. A SOL egy főként fáradtságtűrő izomrostokat tartalmazó extensor izom, amely beidegzése 80%-ban az L5 gerincvelői szegmentumból történik, de kismértékben az L4-es szegmentumból is kap efferens idegrostokat. A TA egy dorziflexor, főként (73%) az L4 szegmentumból kap efferenseket. Az EDL 98%-ban gyors, fáradékony izomrostokat tartalmazó flexor izom, beidegzéséért leginkább az L4-es szegmentum felel (51%) kisebb részben az L3 és L5 (Slawinska 1996). Az utóbbi két izom két izom vizsgálata során figyelték meg a parciális denerváció jelenségét, melynek során az izmot beidegző egyik szegmentum sérülését követően részleges motoros beidegzésvesztés következik be. Felnőtt rágcsálókban ilyenkor a sértetlenül maradt gerincvelői szegmentum motoneuronjainak innerváló territóriumuk akár 5-szörösére nő, így a denervált izomrostokat axonkollaterálisok érhetik el, ez az ún. "sprouting" jelensége. (Gordon és Mao 1994). A parciális denerváció eltérő módon valósul meg a bemutatott izmokban. Rágcsálókban elektromiográfiás kísérletekben megfigyelték azt, hogy a részlegesen denervált, eredetileg gyors, fáradékony izomrostokat tartalmazó EDL fenotípus változáson esik át, a regenerációt követően a SOL-hoz hasonló lassú, fáradtságtűrő sajátosságokat mutat, míg az utóbbi izomban nem történik ilyen típusú átalakulás. (Slawinska és mtsai 1996). Megfigyelték továbbá azt is, hogy neonatális korban a lassú izmok parciális denervációja esetén fennmarad a kiterjedt poliinnervációra jellemző motoneuron territórium, míg a gyors izmok esetében 70%-os denerváció tapasztalható, tehát a motoros egységek által beidegzett izomrostok száma intakt állatokhoz hasonlóan visszacsökken (Connold és mtsai 1992, Tyc és mtsai 1999). A denervált izomzat gyors atrofizációja miatt az új motoros egységek kialakulására nem minden esetben kerülhet sor, ezért az előbb leírt sprouting elősegítésén kívül (*nifedipine* segítségével: Whie és Vrbová 1997). az izom túlélésének elektromos ingerléssel történő meghosszabbítására is vannak terápiás törekvések (Gordon és MAo 1994). Az izom atrofizáció ezen tényezőkön kívül függ még az érintett izmok terheltségétől és az izmok rögzülésének helyzetétől is: a terheletlenül maradt, rövidült helyzetben rögzült izmoknál a legkifejezettebb (Gordon és Mao 1994). Egy

denervált izom funkcionális felépülésének sikeressége tehát számtalan tényező együttesétől függ, ám abban a minden szerző egyetért, hogy kiterjedt sérülés esetében a legfontosabb a sérült gerincvelői szakasz túlélő motoros idegsejtjeinek száma. Eddigi kutatások szerint ha a motoros ellátottság 15%-a intakt marad, az izomrost/motoneuron arány korrelál egy motoros egység által generált erő nagyságával (Gordon és Mao 1994), továbbra is kérdéses azonban, hogy minimálisan mennyi motoros idegsejt túlélését kell biztosítanunk ahhoz, hogy valóban kielégítő funkcionális újraidegzést hozzunk létre. Ez az információ hiány leginkább a rágcsálók funkcionális tesztelésének nehézségeivel magyarázható, a következőkben ezzel a témával szeretnék foglalkozni.

Funkcionális tesztek

Humán esetekben a denervált izmok gyógyulását 5 fokú izomerő értékelő skála segítségével követik nyomon. Az elmúlt néhány évtizedben több módszer látott napvilágot, amellyel rágcsálókban is vizsgálhatóvá vált a végtagok használhatósága, a következőkben a legfontosabb funkcionális tesztek szeretném áttekinteni.

"BBB" (Basso, Beattie and Bresnahan) teszt: Az állatokat nyílt területen megfigyelik és 21 fokozatú pontrendszer segítségével, különböző szempontok alapján értékelik (pl.: 14 pontot jelent, ha az állat teli talppal lép, teljes súlyát ráhelyezi a sérült végtagra, és a mellső-hátsó lábak koordinációja teljes) (Schucht és mtsai 2002). A teszt előnye, hogy széles körben elterjedt protokoll, hátránya, hogy igen szubjektív, számszerű mérések nem történnek.

"Grid walk" teszt: Az állatok eltérő léptékű (1-4 cm) rácson haladnak végig, a teszt során azt vizsgálják, hogy hányszor hibáznak, tehát hányszor lépnek a résekbe (Metz és mtsai 2000). A módszer előnye, hogy digitális, hátránya, hogy kevés információval szolgál a gyógyulás folyamatáról.

"Narrow-beam" teszt: Ebben a vizsgálatban különböző profilú, 1m hosszúságú és 1-2 cm átmérőjű, felfüggesztett rudakat használnak. A funkcionális analízis során az állatoknak végig kell haladniuk a rúdon anélkül, hogy leesnének (Metz és mtsai 2002). A módszer a *grid walk*-hoz hasonlóan lehetőséget biztosít a precíz mozdulatok sikeres kivitelezésének egyszerű vizsgálatára, előnyei és hátrányai hasonlóak ahhoz.

Felfedező viselkedés teszt: Egy 100cm x 80 cm-es nyílt felületet 9 egyenlő részre osztanak, és azt vizsgálják, hogy 5 perc alatt hány területet érint mozgása közben az állat (Schucht és mtsai 2000). Előnye az egyszerűség, hátránya, hogy kevés információt ad a regenerációról.

Talplenyomat analízis: Ebben a kísérletben az állatok talpát tintapárna segítségével megfestik, majd egy 1m x 7cm-es papírlapon haladnak végig. A teszt során megvizsgálják, hogy a sérült végtag talplenyomata mekkora szögbeli eltérést mutat a futás irányához képest (Fouad és mtsai 2000). Az analízis során endo/exorotáció is megfigyelhető, ezért a standardizáció nehézkes, így a szögek vizsgálata helyett 4 fokú skála segítségével végzik az adatok kiértékelését (0: dorzális lépés, a hátsó láb vonszolása, 1: legalább 3, háromujjas lábnyom, 2: endo/exorotáció 3:nincs rotáció).

Kinematikus analízis: A vizsgálat során fekete pontokkal megjelölik a hátsó végtag nagyobb csontjainak ízesülésénél a bőrt, majd az állatok mozgásáról (síkon, létrán, vagy taposómalmon) nagy sebességű videofelvételeket készítenek. A felvételek képkockáit elemezve a csontok egymással bezárt szögeit vizsgálják a mozgás kiválasztott pillanataiban. Ez a fajta analízis lehetőséget biztosít a csontok talajjal bezárt szögének vizsgálatára is, kaudális vagy laterális irányból (Metz és mtsai 2002, Fey és mtsai 2010). A bemutatott vizsgálatok közül ez a teszt képes a legárnyaltabb képet adni a regeneráció állapotáról, hátránya az eszközigényesség, a nagy mennyiségű generált adat, és az előzetes tréning szükségessége.

A bemutatott vizsgálati rendszerek a kinematikus analízis kivételével egyenként kevés információval szolgálnak ahhoz, hogy segítségükkel képesek legyünk kismértékű különbségek kimutatására a regenerálódó kísérleti állatok között, együtt pedig nehézkesen használhatóak, mivel a tesztek eredményei egyazon sérülést vizsgálva is kevésbé korrelálnak (Metz és mtsai 2000). Ezen felül a kinyert adatok sok esetben a sérülés mértékével sem arányíthatók, gerincvelő-zúzódások esetében BBB tesztet és grid walk vizsgálatot alkalmazva például csak a BBB teszt mutatott összefüggést a lézió méretével (Schucht és mtsai 2002). A technika fejlődésével a videoanalízisre épülő kinematikai tesztek egyre inkább elérhetővé válnak. A mérni kívánt paraméterek megfelelő kiválasztása mellett ez a módszer lehet a legalkalmasabb a funkcionális regeneráció kis különbségeinek kimutatására.

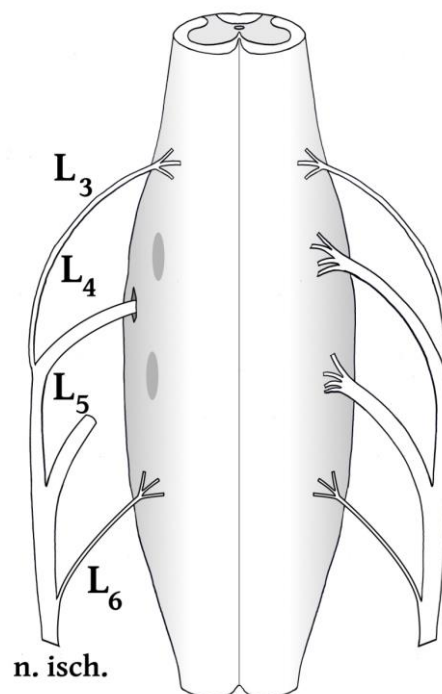
Célkitűzések

1. Létrehozni egy olyan kinematikus tesztrendszert, amely segítségével a lehető legnagyobb hatékonysággal gyűjthetünk adatokat az állatok mozgásának paramétereiről
2. A létrehozott tesztrendszer segítségével különböző dózisú riluzole kezelésben részesült, avulzió és reimplantációs műtéten átesett modellállatok vizsgálata a kielégítő funkcionális újraidegzéshez szükséges minimális motoneuronszám megállapítása céljából.

Anyagok és módszerek

Műtéti beavatkozások

Kísérletünkben nőstény Sprague-Dawley patkányokat használtunk (170-200 g), amelyeket ketamin-xylazin (50 mg/kg-5 mg/kg) segítségével elaltattunk. Az L1 csigolyákat feltártuk és laminektómiát hajtottunk végre. A baloldali L4 és L5 ventrális gyökér átvágását követően megkerestük a L4, L5 gerincvelői ventrális gyökeret és Dumont #5 típusú óráscsipesszel kihúztuk azokat. Ezek után az L4 gyökér reimplantációját hajtottuk végre az eredeti eredési hely közelében (1. ábra). Az L5-ös gerincvelői mellső gyökér beültetésére azért nem került sor, hogy kivédjük a már bemutatott parciális denerváció következményeit a végtagizmokban. A műtét elvégzését követően a sebet zártuk, és az állatokat 37°C-os melegítőpadon, folyamatos felügyelet alatt tartottuk az altatószer hatásának megszűnéséig. A beavatkozások során a minimális fájdalom és szenvedés okozására törekedtünk a Helsinki Deklarációt figyelembe véve. A műtétek az SZTE ÁOK etikai bizottság engedélyével zajlottak.



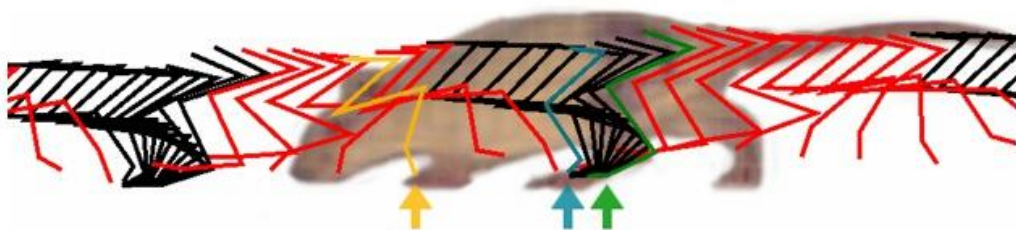
1. ábra: Az L4-L5 avulzió és L4 reimplantáció sematikus bemutatása.

Riluzole-kezelés

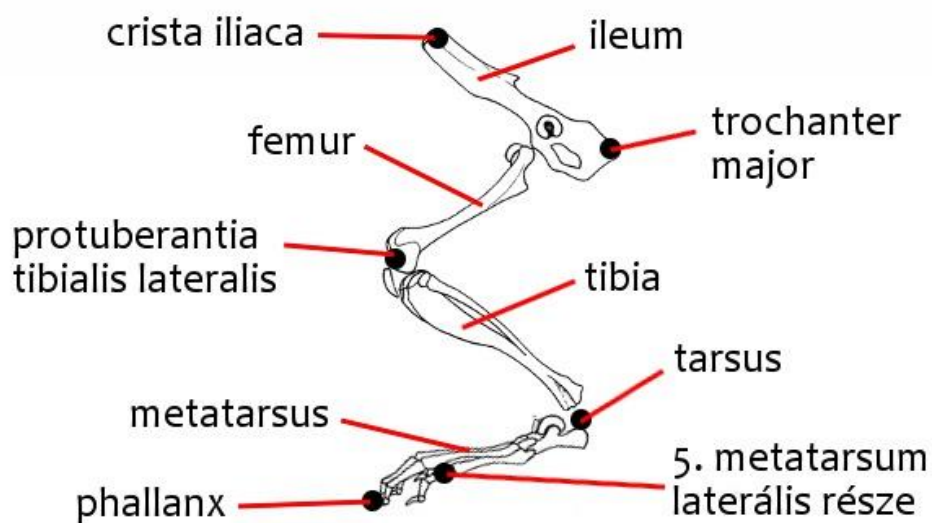
A riluzole kezelést az avulziós műtétet követően azonnal megkezdjük és 2 héten keresztül kétnaponta intraperitonálisan végeztük korábbi kísérleteinkben megállapított protokoll alapján. Létrehoztunk egy csoportot ($n=3$) amely 0,4 mg/testsúly kilogramm dózisban kapta a riluzole-t, és egy másikat, amelyben 0,8 mg/testsúly kg dózisú riluzole kezelésre került sor. ($n=3$). Felállítottunk egy kontroll csoportot is ($n=3$) ezek az állatok riluzole-t nem kaptak.

Funkcionális tesztek

Az állatokat a műtéteket követő 5. héttől kezdve a 12. hétig minden héten egy alkalommal funkcionális tesztnek vetettük alá. Elsőként leborotváltuk műtött oldali hátsó végtagokról a szőrt és a szakirodalomban leírtak szerint fekete pontokat festettünk a hátsó végtag főbb ízületei feletti bőrreszkekre.(3. ábra) A teszt során a patkányoknak egy 100cm x 7 cm-es halogén lámpákkal megvilágított plexi falú kifutón kellett végighaladniuk egy menedéket nyújtó és jutalmat rejtő fa házig. Az átlátszó padló alá 45 fokos szögben tükröt rögzítettünk így az állatok talpfelülete láthatóvá vált oldalirányból a kifutóra tekintve. Az állatok mozgásáról videofelvételek készültek a műtött oldal felőli, és hátsó irányból, 100 képkocka/másodperc sebességgel. A műtétet megelőzően 3 héten keresztül hetente egy alkalommal gyakoroltattuk minden állattal a tesztfeladatot és a műtétet megelőző utolsó teszt alkalmával az intakt állatokról is egyenként felvételeket készítettünk. A videofelvételek elemzésekor az adott héten rögzített anyagok közül minden állat esetében kiválasztottunk három részletet, amelyen három teljes lépésciklus látható, amit a patkány egyenletes sebességgel, megszakítás nélkül tesz meg. A lépésciklus alapvetően a támasztó és lengő fázisra osztható, mi vizsgálatainkat az állófázis kezdetének, végének, valamint a lengő fázis közepének adott időpillanatában végeztük. (2. ábra)



2. ábra: A patkány lépésciklusa. Piros színnel jelölt a lengő fázis, fekete színnel a támasztó fázis. A színes nyilak azokat a pillanatok jelölik, amelyekben a vizsgálatokat végeztük.



3. ábra: A patkány hátsó végtag főbb csontjai és kinematikus analízishez felfestett pontok pontos elhelyezkedése.

A felvételeket szoftver segítségével (Virtual Dub) képkockákra bontottuk és az alábbi paramétereket választottuk ki az állatok regenerációjának vizsgálatához:

Oldalnézetű felvételek elemzése:

1. A tarsus talajjal bezárt szöge: A 4. ábra A részén látható módon a tibia és talaj által bezárt szöget vizsgáltuk az egyes állatcsoportokban az állófázis fázis végének utolsó pillanatában.

2. A talpfelület laterális rotációja: A talplyomat analízishez hasonlóan azt vizsgáltuk, hogy a lépések során mekkora rotáció tapasztalható a kifutó haladási iránya által meghatározott egyenes és a metatarsus és tarsus által meghatározott egyenes bezárt szöge alapján. Ezt a paraméter is az állófázis végén vizsgáltuk. A mérést a 4. ábra B része szemlélteti. Ebben a tesztben csak az exorotációt mutató állatoknál végeztünk méréseket

3. Térd flexió mértéke: A 4. ábra C képen látható módon minden állaton megvizsgáltuk a femur és a tibia csontok által bezárt szöget az állófázis kezdetén.

4. A boka flexió mértéke: Hasonlóan a térd flexióméréshez megvizsgáltuk a tarsus és a tibia által bezárt szögeket is az állófázis kezdeti pillanatában (4. ábra D)

5. A lépés hossza: Minden állatban megvizsgáltuk a 3 egymást követő lépésciklus térbeli hosszúságát (4. ábra E). A pontos méréseket ebben az esetben a futópad oldalába karcolt 1x1 cm-es négyzetrács segítette.

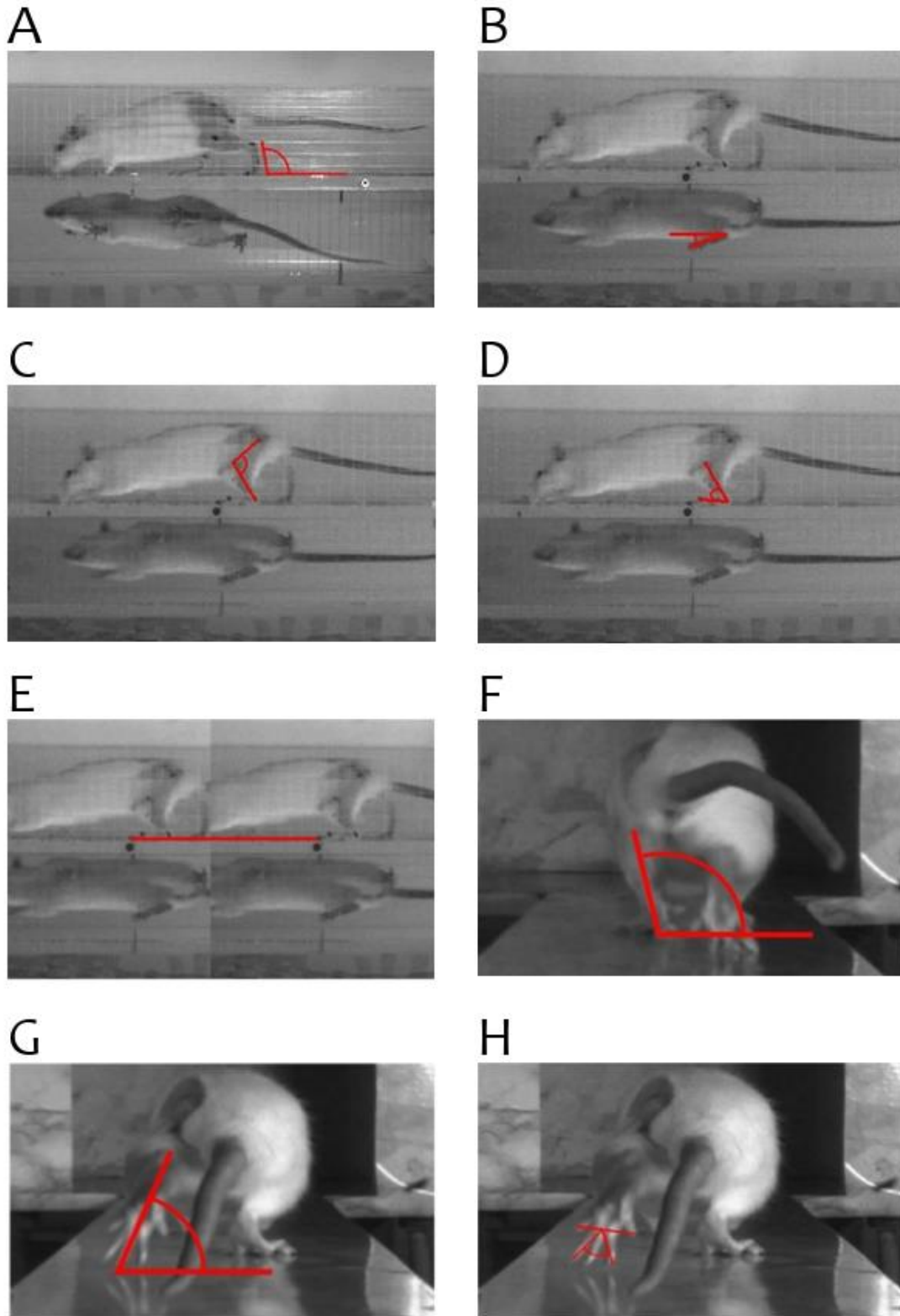
6. A támasztó és lengő fázis időbeli megoszlása: A képekre bontott videofelvételeken megszámoltuk azokat a kocákat, amelyeken az állatok lába a levegőben volt és azokat is, amelyeken a földhöz ér, így a konstans 100 képkocka/másodperces felvételi sebesség alapján ki tudtuk számolni a támasztó és lengő fázis időbeli megoszlását 3x3 egymást követő teljes lépésciklusban. Ezt az értéket csak az utolsó, 12. teszthéten mértük, mert az egyes állatok különböző időpontokban érték el a regenerációnak azt a szintjét, amelyben már képesek voltak felemelni a műtött oldali hátsó végtagjukat, tehát megvalósulhatott a lengőfázis.

Hátulnézeti videofelvételek elemzése:

7. A tibia talajjal bezárt szöge: Az állófázis kezdetekor megvizsgáltuk a tibia talajjal bezárt szögét kaudális irányból is. A mérést a 4. ábra F része mutatja be.

8. A metatarsus talajjal bezárt szöge: A lengő fázis közepén minden tesztállatunkon megmértük a metatarsus és a talaj által bezárt szöget hetente egy alkalommal.

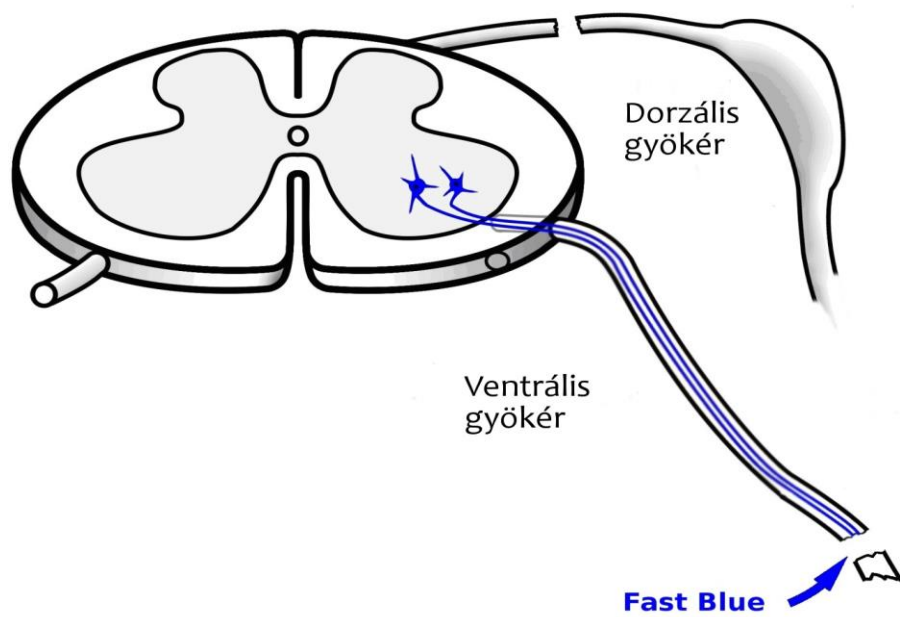
9. Az lábujjterpesztés vizsgálata: Szintén a lengő fázis közepén megfigyelhető az ún. "spreading" reflex, melynek során a lépés előkészítéseként az állatok egy pillanatra szétterpesztik a hátsó végtag ujjait. A mérés során összekötöttük az 1. és 5. ujj végpontját egy egyenessel, majd ennek az egyenesnek a felezőpontját tekintettük szögcsúcsnak, a 2. és 4. ujj végei felé bocsátott egyeneseket pedig a vizsgált szög szárainak (4. ábra H rész). Ez a mozdulat csak a magasabb szintű regeneráció esetén tér vissza, ezért csak a 12. héten hasonlítottuk össze a mért értékeket.



4. ábra: A kinematikai analízis vizsgált paramétereit: **A:** a tarsus talajjal bezárt szöge **B:** a talpfelület laterális rotációja **C:** a térd flexió szöge **D:** a boka flexió szöge **E:** a lépés hossza **F:** a tibia talajjal bezárt szöge **G:** a metatarsus talajjal bezárt szöge **H:** a lábujjterpesztési reflex szöge.

Szövetteni eljárások

A 12. héten az állatokat ketamin-xylazine altatásban (50 mg/kg-5 mg/kg) feltártuk és átvágtuk az L4-es gerincvelői ideget, a proximális csomagra pedig Fast Blue fluoreszcens jelölőanyag kristályait helyeztük (FB, Illing plastics GmbH, Breuberg, Németország). A festék jellegzetessége, az, hogy az alkalmazás helyétől retrográd irányban a mikrotubulusok segítségével a neuronok szómájába és dendritjeibe transzportálódik, ahol a festék jelenléte fluoreszcens mikroszkóp segítségével detektálható. Ily módon azokat a sejteket jelöltük meg, amelyek új axont növesztettek a denervált végtagizmokhoz. Három nappal a jelölést követően az állatokat ketamin/xylazin segítségével túlaltattuk. A mellüreg felnyitását követően a jobb pitvart bemetszettük, majd kanült vezetünk az aortába a bal kamra átszúrását követően. Elsőként fiziológiás sóoldattal mostuk át az állatok keringési rendszerét, amelybe heparint kevertünk (50 µl/100 ml), hogy megakadályozzuk a véralvadást. A fiziológiás sóoldattal történő mosást követően kipreparáltuk a műtött oldali EDL és TA izmokat, amelyeket a későbbi vizsgálatokig -80°C-on tárolunk. Ezek után 4%-os paraformaldehidet juttattunk az érhalózatba. A szövetek fixálását követően a lumbalis gerinccsatornát óvatosan felnyitottuk, és kipreparáltuk a lumbalis gerincvelői szegmentumot. Ezt egy éjszakára 4%-os paraformaldehidbe helyeztük, majd további 1 napon keresztül 0,01% Na-azidot tartalmazó 30%-os szacharóz oldatban tároltuk. A kipreparált lumbalis gerincvelőről óvatosan eltávolítottuk az agyhártyákat, majd Tissue-Tek (Shandon, Egyesült Királyság) segítségével beágyaztuk az L3-L5 szegmentumot. Leica CM1850 típusú kriosztátban -20°C-on 25 µm vastagságú keresztmetszeteket készítettünk, amelyeket zselatinos tárgylemezre húztunk fel. A tárgylemezeket 3x5 percig PBS-ben mostuk, majd PBS és glicerin 7:3 elegyével lefedtük. A metszeteiken a Fast Blue-jelölt sejteket fluoreszcens mikroszkóp (Olympus BX50) segítségével detektáltuk, majd megszámláltuk. A metszetekről reprezentatív céllal fényképeket készítettünk. A retrográd jelölést és sejtszámlálást intakt gerincvelőkön is elvégeztük (n=5)



5. ábra: Az L4 gerincvelői szegmentumban túlélő motoneuronok retrográd FB jelölése.

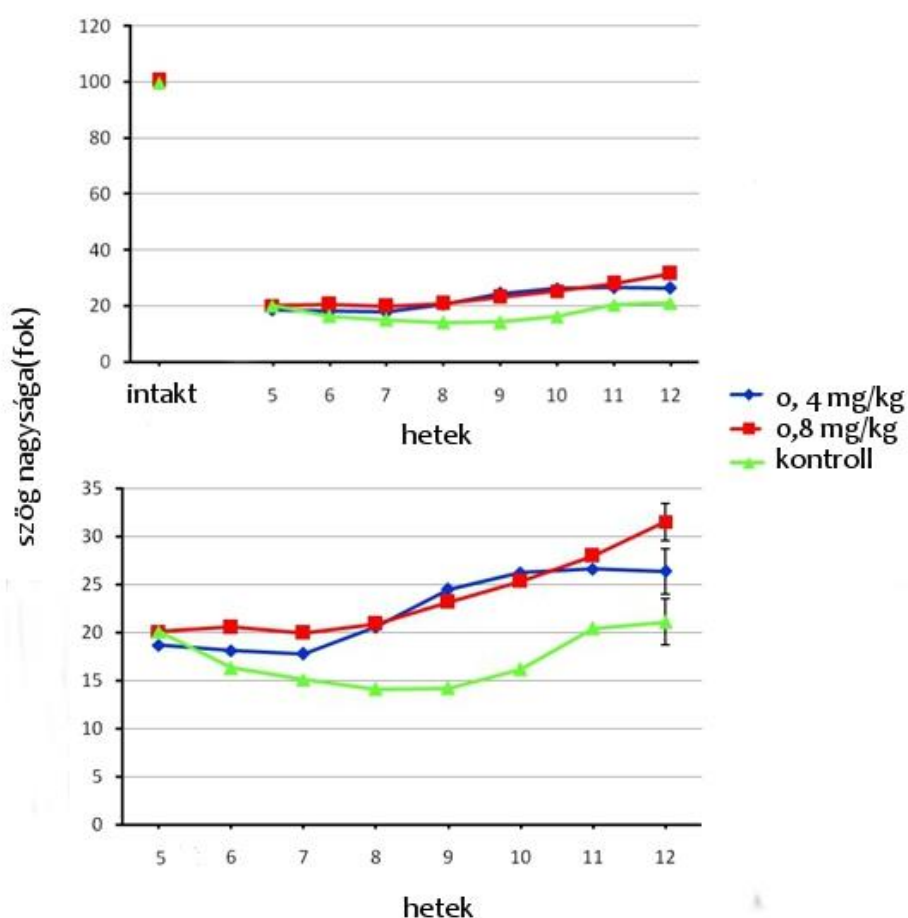
Eredmények

A funkcionális tesztek eredményei

1. A tarsus talajjal bezárt szöge az állófázis végén

A mérés eredményeit az. 1. grafikon foglalja össze. Szignifikáns különbségről az alacsony elemszám miatt egyelőre egyik paraméter esetében sem beszélhetünk, de látható, hogy a teszt segítségével igen finom eltérések is kimutathatóak az egyes csoportok között. A tesztidőszak végén a várakozásainknak megfelelően a legjobban a 0,8 mg/kg riluzole kezelésben részesült csoport teljesített, ezt követte a 0,4 mg/kg dózist kapott csoport, legrosszabbul pedig a kontroll állatok teljesítettek. Ezek az értékek messze alulmúlták a műtétet megelőzően mért intakt értékeket, de minden csoportban javulást tapasztaltunk, ami a riluzole-kezelt csoportokban volt a legkifejezettebb.

A tarsus talajjal bezárt szöge

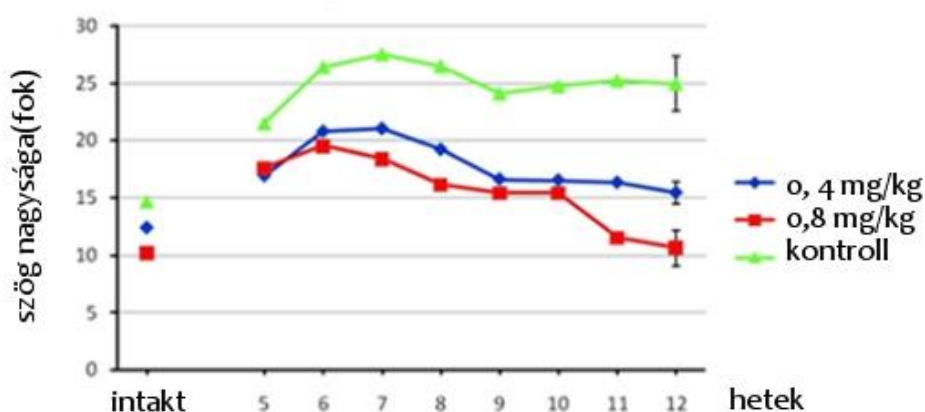


1. grafikon: A tarsus talajjal bezárt szöge az állófázis végén. Az alsó grafikonon kinagyítva láthatók az eltérések.

2. A talpfelület laterális rotációjának mértéke

Az 2. grafikonon látható a talp exorotációjának szöge. A 0,8 mg/kg riluzole-t kapott csoportok állatai megközelítően intakt értékeket produkáltak a tesztidőszak végére, míg a kezeletlen állatokban alig mutatkozott javulás. A rotáció mérés eredményei a teljes tesztidőszak alatt különbséget mutatnak az eltérő dózisu riluzole kezelésben részesült állatok regenerációjában.

A laterális rotáció mértéke

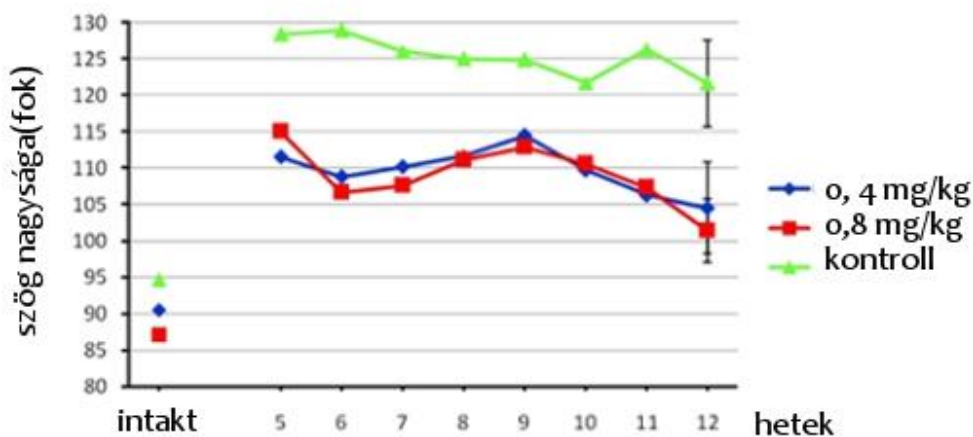


2. grafikon: a laterális rotációs szög nagysága a tesztidőszak időtartama alatt

3. Térd flexió mértéke

A térd flexió mérésének eredményei szerint a riluzole kezelt csoportok között kevés eltérés mutatkozott a femur és a tibia által bezárt szög nagyságában, de kontroll csoportok állataihoz képest sokkal jobban teljesítettek a kezelt állatok (3. grafikon). Bár az intakt értékektől elmaradtak a riluzole-kezelt csoportok is, a javuló tendencia egyértelmű.

A térd flexió mértéke

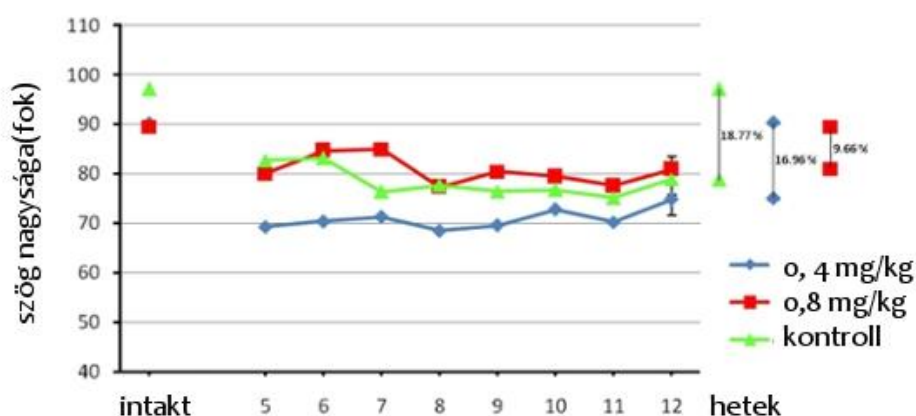


3. grafikon: a femur és tibia által bezárt szög alakulása a tesztidőszak alatt

4.A boka flexió mérés

A bokaízületnél mért szög nagyságában az intakt állatok a műtétet megelőző héten nagy eltérést mutattak, ami a kis elemszám miatt erősen befolyásolta a mérési eredményeket (4. grafikon). A későbbi kontroll csoport állataiban sokkal nagyobb mértékű ezt a szöget a betanítás utolsó hetében, ezért ennél a tesztől a funkcionális javulás görbéit az intakt mérés értékeihez hasonlítottuk minden csoportban. A különbség a 12. teszthéten 0,8 mg/kg dózisú riluzole kezelést kapott állatok között a legkisebb ezt a csoportot követi a 0,4 mg/kg riluzole-lal kezelt csoport, és a legkevésbé a kontroll állatok közelítették meg az intakt értékeket.

A boka flexió mértéke

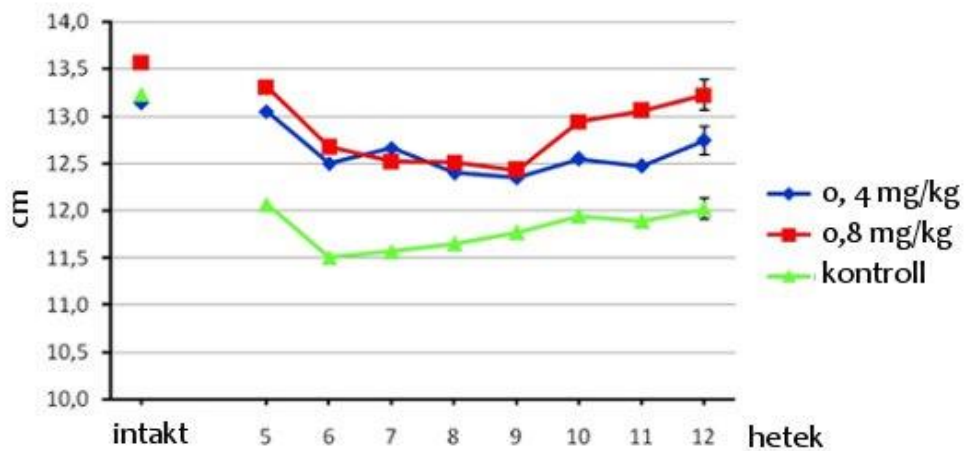


4. grafikon: A tibia és a tarsus által bezárt szög nagysága az állófázis kezdetén.

5.A lépéshossz- mérés eredménye

A lépéshossz mérés eredményeit az 5. grafikon tartalmazza. Szembetűnő, hogy a kontroll csoport értékei jelentősen elmaradnak a két riluzole-kezelt csoport értékeitől, valamint az, hogy a 0,8 mg/kg koncentrációjú riluzole-t kapott állatok a 9. héttől látványos javulást mutattak. A tesztidőszak végére a lépéshossz mérés értékei is meggyőző különbségeket mutattak az egyes állatcsoportok között.

A lépéshossz-mérés

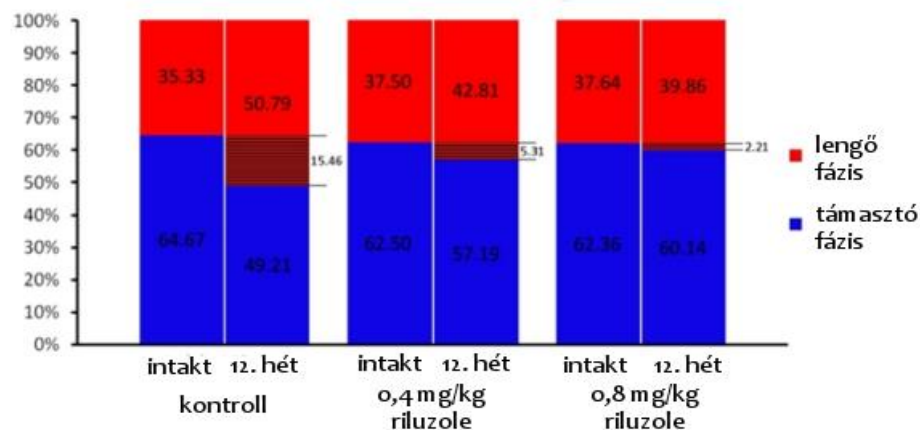


5. grafikon: A műtött oldali hátsó végtag által megtett út hossza egy lépésciklus alatt.

6. Az lengő és támasztó fázis időbeli megoszlása

A 12. héten megmértük, hogy a lépésciklusokon belül hogyan oszlik meg a lengő és támasztó fázis időtartama. Az 1. diagramm tanulsága szerint minél kisebb a reinnerváció mértéke, annál több időt tölt a műtött oldali hátsó végtag a levegőben. A teszt képes kimutatni az eltérő dózisú riluzole-kezelések közötti különbséget, és szemlélteti a kezelés hatékonyságát a kontroll csoportokban tapasztalhatókhöz képest.

A lengő és támasztó fázis megoszlása

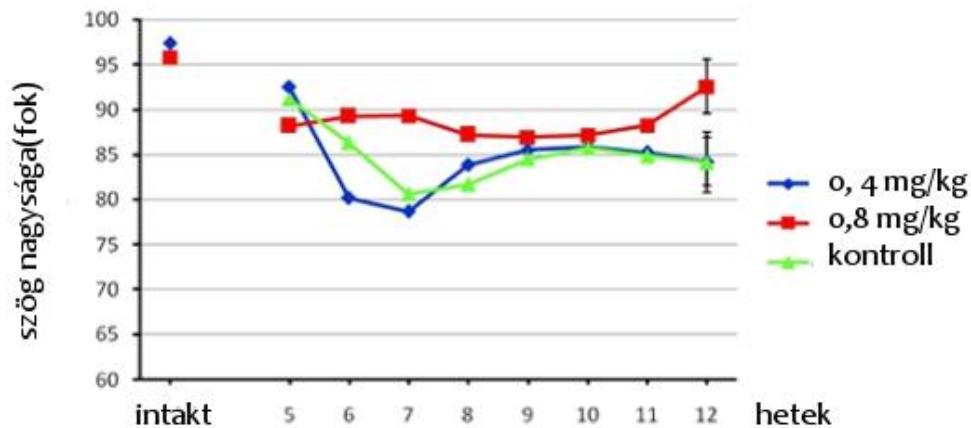


1. diagramm: A lengő és támasztó fázis időbeli megoszlása a lépésciklusokon belül.

7. A tibia talajjal bezárt szöge

A 6. grafikon a kaudális irányból végzett tibia vizsgálat eredményeit mutatja. Ezzel a teszttel csak a 0,8 mg/kg dózisú riluzole-lal kezelt csoport esetében tudtuk a javulást kimutatni, ennek oka, hogy alacsony reinnervációs esetben ez a szög igen változó lehet akár néhány lépésen belül is.

A tibia talajjal bezárt szöge

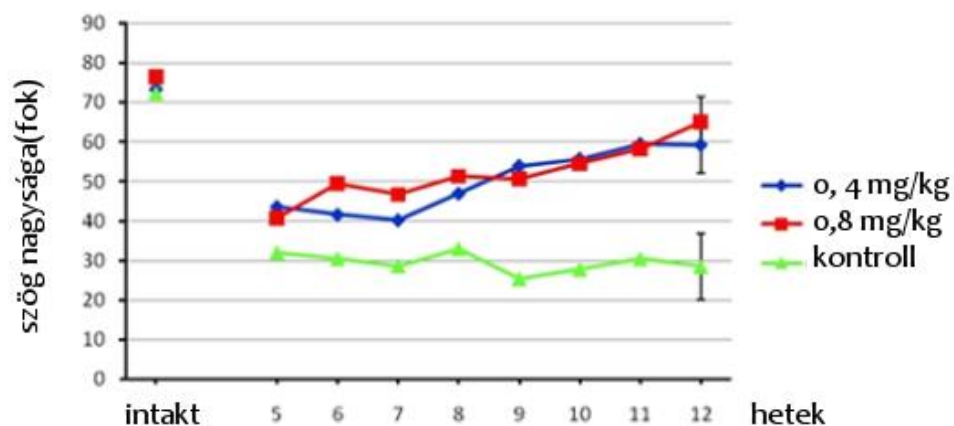


6. grafikon: a tibia talajjal bezárt szöge kaudális nézetből a támasztó fázis kezdetén

8. A metatarsus talajjal bezárt szöge

A lengő fázis közepén megmértük a metatarsus talajjal bezárt szögét. Az eredményeket a 7. grafikon foglalja össze, szembetűnő, hogy a kontroll csoport állatai sokkal rosszabbul teljesítettek a másik két csoportnál, valamint az, hogy a riluzole-kezelt csoportok a 9. héttől itt is egyenletes javulást mutatnak, és a 0,8 mg/kg riluzole kezelésben részesült csoport megközelíti a műtét előtt mért értékeket.

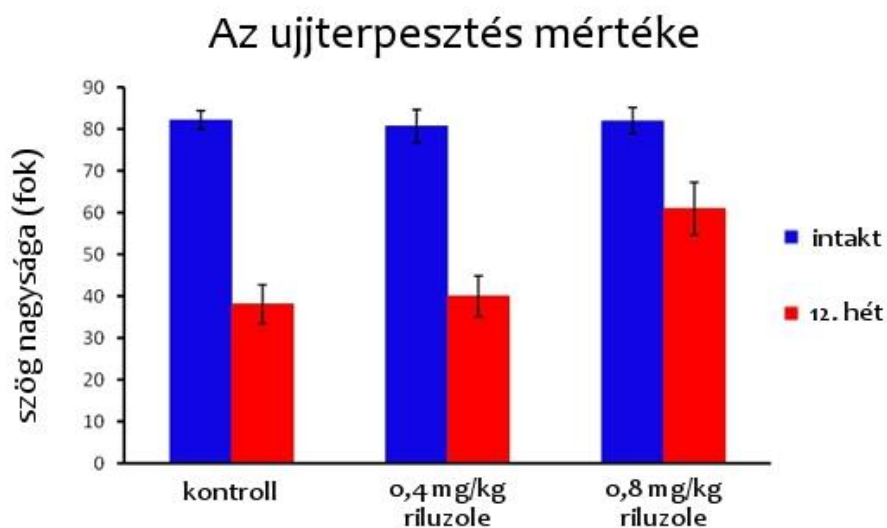
A metatarsus talajjal bezárt szöge



7. ábra: A metatarsus talajjal bezárt szöge az egyes csoportokban a tesztidőszak alatt.

9. A lábujjterpesztés mértéke

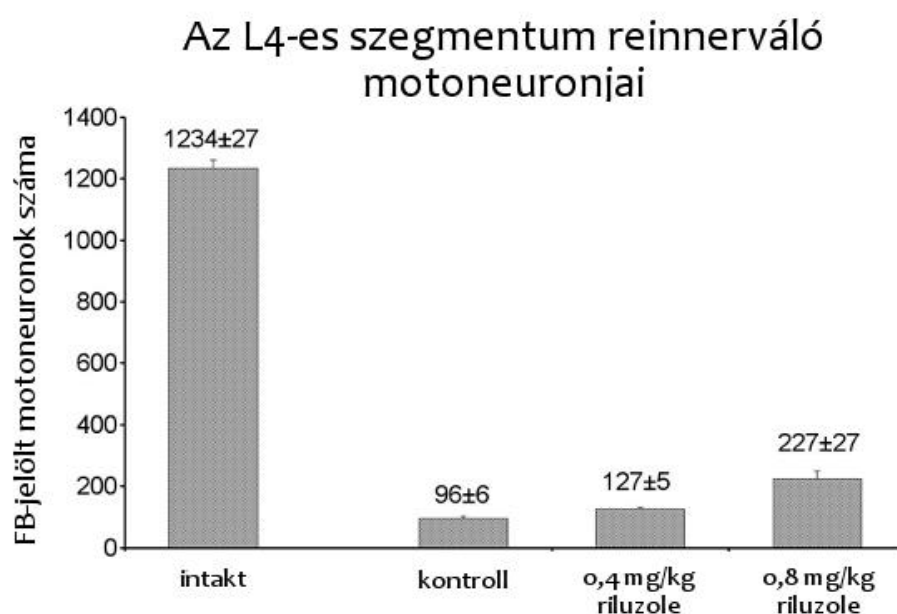
A 12. héten megmértük a műtött oldali hátsó végtagon a lábujjterpesztő reflex mértékét. A 2. diagrammon látszik, hogy a 0,8 mg/kg dózisú riluzole kezelésben részesült csoport állatai sokkal jobban teljesítettek a másik kettő csoport állatainál, amelyek között csak kis különbséget tudtunk kimutatni a 0,4 mg/kg dózisú riluzole-lal kezelt csoport javára.



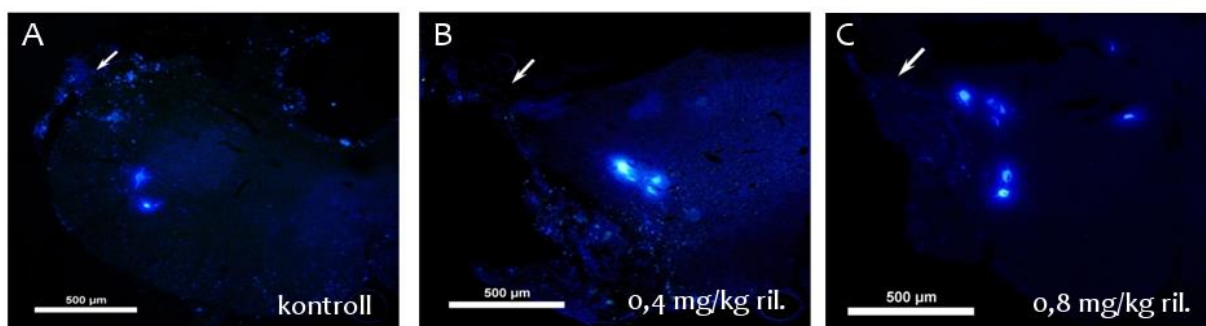
2. diagramm: A lengő fázis közepén megmért, ujterpesztést jellemző szög nagysága az egyes állatcsoportokban a 12. teszthéten

Morfológiai eredmények

A sejtszámolás eredményeit a 3. diagramm mutatja be. A funkcionális eredményekhez hasonlóan itt sem találtunk szignifikáns különbségeket, ami a csoportok alacsony elemszámával magyarázható. Látható, hogy az L4-L5 avulziót követő L4 reimplantáció neuroprotektív kezelés nélkül az L4 motoros idegsejtek több mint 90%-át elpusztította. 0,4 mg/kg dózisú riluzole kezeléssel a motoneuronok több, mint 10%-a menthető meg, 0,8 mg/kg riluzole alkalmazásával csaknem kétszeresére növelhető a L4-es szegmentum reinnerváló motoros idegsejtjeinek száma.



3. diagramm: Az L4 szegmentum reinnerváló, FB-jelölt motoneuronjai az egyes csoportokban



6. ábra: A reinnerváló motoros idegsejtek jellemző megjelenése az egyes műtéti csoportokban. A fehér nyíl a visszaültetett mellső gyökeret jelzi.

Diszkusszió

Diplomadolgozatomban bemutatott munkánkban kísérleti állatok gerincvelőjének L4-L5 avulzióját, és az L4 ventrális gyökér reimplantációját végeztük el, majd különböző dózisú riluzole kezelés hatását vizsgáltuk funkcionális tesztek során. Az L5 ventrális gyökér avulziójára és a gerincvelőbe vissza nem helyezésére az un. parciális denerváció sajátos kórképének elkerülése miatt volt szükség, az L4 gerincvelői szegmentumhoz tartozó végtagizmokat így nem reinnerválták L5 motoneuronok. Kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy funkcionális tesztek segítségével lehetséges-e az eltérő dózisban alkalmazott riluzole-kezelés hatására létrejövő különböző regenerációs szintek beható vizsgálata? Munkánk során egyedi kinematikus elemzésen alapuló funkcionális tesztrendszer fejlesztettünk ki, amelyre azért volt szükség, mert végső célunk annak a minimális motoneuron számnak a pontos meghatározása, amely a végtag kielégítő funkcionális újraidegzéséhez elegendő. Ilyen méréshez pedig a szakirodalomban fellelhető tesztek felbontása nem elégséges.

A műtétet követő 12. héten retrográdan transzportálódó FB fluoreszcens jelölőanyaggal végzett sejtszámolás eredményei alapján elmondhatjuk, hogy a riluzole koncentrációjának emelésével növekedett azon motoros idegsejtek száma, amelyek axont növesztettek a denervált végtagizom felé. A mozgás 9 vizsgált paraméterének elemzését követően kimutattuk, hogy bár az egyes paraméterek különböző mértékben, de javulást mutattak a kezelés hatására, és funkcionális javulás arányos a túlélő motoneuronok számával. Tesztrendszerünk különbséget mutatott ki olyan csoportok között is, amelyek átlagos reinnerváló motoneuronjainak száma mindössze 30-al különbözött. Ezt az érzékenységet megfelelőnek tartjuk a funkcionális újraidegzés különbségeinek kimutatására még kismértékű morfológiai reinnerváció esetében is.

Célunk a továbbiakban a csoportok elemszámainak növelése, valamint új, magasabb dózisú riluzole kezelésben részesülő csoportok felállítása (1,2 mg/kg), hiszen a kívánt klinikai 4-es izomerőmérésnek megfelelő funkcionális reinnervációt jelen kísérletünkben még nem sikerült kimutatnunk. Tervezzük továbbá a tesztidőszak növelését, mert a legtöbb funkcionális tesztben a 9. héttől kezdődött meg a riluzole-

kezelt csoportok javulása, és a 12. posztoperatív hétre a görbék még nem érték el a plató fázist.

Tesztrendszerünk előnye, hogy akár a későbbiekben is bővíthetjük a vizsgált paraméterek palettáját, hiszen a készített videók a jövőben is tovább elemezhetők. További munkánk során morfológiai módszerekkel megvizsgáljuk a kipreparált soleus és TA izmok motoros véglemezeit, hogy további információkat kapjunk az ideg-izom kapcsolat helyreállításáról.

Felállított kísérleti rendszerünk tehát alkalmas a kielégítő regenerációhoz szükséges minimális motoneuron szám meghatározására, ez az információ pedig a jövőben hozzájárulhat a humán gerincvelő sérülések helyreállítására alkalmazandó terápiák hatékonyságának eldöntésére.

Irodalomjegyzék

Bensimon G., Lacomblez L., Meininger V. (1994): A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis A.L.S. Riluzole Study Group. N. Engl. J. Med. 330, 585-591

Bergersen LH., Thomas M., Jóhannsson E. Waerhaug O. Halestrap A. Andersen K. Sejersted OM. Ottersen OP.(2006): Neuroscience 1105-1113

Buller AJ., Mommaerts WFHM., Seraydarian K. (1969): 205(3): 581–597

Carlstedt T. (2008): Root repair review: Basic science background and clinical outcome Rest. Neurol. Neurosci. 26, 225-241.

Coleman M.P., Freeman M.R. (2010): Wallerian degeneration, Wlds, and Nmnat Annu Rev Neurosci. 33:245-67.

Connold AL., Fischer TJ., Maudarbocus S., Vrbová G. (1992): Response of developing rat fast muscles to partial denervation . Neuroscience vol. 46,No. 4, pp. 981-988

Connold AL., Vrbová G.(1991): Temporary loss of activity prevents the increase of motor unit size in partially denervated rat soleus muscles J. of Phys. 434, pp.107-119

Coura AS., Enders BC., de Franca IS., Vieira CE., Dantas DN., De Menezes DJ. (2013): Ability for self-care and its association with sociodemographic factors of people with spinal cord injury. Rev. esc. enferm. USP vol.47 no.5

Choi D.W. (1992): Excitotoxic cell death. J Neurobiol. 23(9):1261-76

Doble A. (1996): The pharmacology and mechanism of action of riluzole. Neurology 47, S233-S241. Duprat F., Lesage F., Patel A. J., Fink M., Romey G., Lazdunski M. (2000): The

Neuroprotective agent riluzole activates the two p domain K⁺ channels TREK-1 and TRAAK Mol. Pharmacol. 57, 906-912.

Fey A., Schachner M., Irintchev A. (2010): A Novel Motion Analysis Approach Reveals Late Recovery in C57BL/6 Mice and Deficits in NCAM-Deficient Mice after Sciatic Nerve Crush. J. of Neurotrauma 27:815–828 (May 2010)

Fouad K., Gerlinde A., Metz S., Merkler D., Dietz V., Schwab ME. (2000): Treadmill training in incomplete spinal cord injured rats. Behavioural Brain Research 115 107–113

Linda H., Risling M., Cullheim S. (1985): Dendroaxons in regenerating motoneurons in the cat: do dendrites generate new axons after central axotomy? Brain Res, 358, 329-333.

Fouad K., Metz ASG., Merkler D., Dietz V Schwab ME. (2000): Treadmill training in incomplete spinal cord injured rats. Behavioural Brain Research 115 107–113

Gordon T., és Mao J. (1994): Muscle Atrophy and Procedures for Training After Spinal Cord Injury. Phys. Ther, 74:50-60

Hasler R.M., Exadaktylos A.K., Bouamra O., Benneker L.M., Clancy M., Sieber R., Zimmermann H., Lecky F. (2011): Epidemiology and predictors of spinal injury in adult major trauma patients: European cohort study Eur Spine J. 2011 Jun 5

Metz ASG., Merkler D., Dietz V., Schwab ME., Fouad K. (2000): Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats. Brain Research 883 165–177

Middleton J.W., Dayton A., Walsh J., Rutkowski S.B., Leong G., Duong S. (2012): Life expectancy after spinal cord injury: a 50-year study

Nógrádi A. (2005): Transplantation of neural tissue into the spinal chord. Landes Bioscience.

Nógrádi A., Szabó A., Pintér S., Vrbová G. (2007): Delayed riluzole treatment is able to rescue injured rat spinal motoneurons *Neuroscience* 144, 431-438.

Nógrádi A., Vrbová G. (2001): The effect of riluzole treatment in rats on the survival of injured adult and grafted embryonic motoneurons *Eur. J. Neurosci.* 13, 113-118.

Isson T., Lundberg C., Lidman O., Piehl F. (2000): Genetic regulation of nerve avulsion-induced spinal cord inflammation. *Ann N Y Acad Sci*, 917, 186-196.

Piehl F., Hammarberg H., Tabar G., Hokfelt T., Cullheim S. (1998): Changes in the mRNA expression pattern, with special reference to calcitonin gene-related peptide, after axonal injuries in rat motoneurons depends on age and type of injury. *Exp Brain Res*, 119, 191-204.

Pintér S., Glovitzki B., Szabó A., Márton G., Nógrádi A. (2010): Increased Survival and Reinnervation of Cervical Motoneurons by Riluzole after Avulsion of the C7 Ventral Root *Journal of Neurotrauma* 27:2273-2282

Ribchester RR., Barry JA. (1994): Spatial versus consumptive competition at polyneurally innervated neuromuscular junctions. *Exp. Phys.*, 79, 465-494

Schucht P., Raineteau O., Schwab ME., Fouad K. (2002): Anatomical Correlates of Locomotor Recovery Following Dorsal and Ventral Lesions of the Rat Spinal Cord. *Exp. Neurology* 176, 143–153

Slawinska U., Tyc F, Kasicki S, Vrbová G. (1996): Functional reorganisation of the partially denervated hindlimb muscle in rat. *Acta Neurobiol. Exp.* 56:441-447

Tyc F, Slawinska U., Vrbová G. (1999): The age dependent effect of partial denervation of fast muscles on their activity. *Acta Neurobiol. Exp.* 59:105-114

White CM., Vrbová G.(1997): Recovery of rat skeletal muscles after partial denervation is enhanced by treatment with nifedipine. Brain Research 779 125–135

Yongchao W, Kajana S, Yang T. Diana S., Chow L., Buttigieg J., Fehlings MG. (2013): Delayed Post-Injury Administration of Riluzole Is Neuroprotective in a Preclinical Rodent Model of Cervical Spinal Cord Injury. J. of Neurotrauma 30:441–452

Young W. (2002): Spinal cord contusion models. Prog Brain Res. 137:231–55.

Zaheer AR., Gundersen K. (2009) The ups and downs of gene regulation by electrical activity in skeletal muscles. J. Muscle Res Cell Motil. 30:255-260

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Nógrádi Antalnak, hogy egyetemi tanulmányaim alatt helyet biztosított számomra kutatócsoportjában. Köszönet illeti Márton Gábort, Gál Lászlót, Fekécs Zoltánt és Dr. Pintér Sándort munkáim során nyújtott segítségükért, valamint szeretném megköszönni családomnak és barátnőmnek az odaadó támogatást.

Nyilatkozat

Alulírott Török Dénes György, Biológus MSc. szakos hallgató, kijelentem, hogy a diplomadolgozatban foglaltak saját munkám eredményei, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök, stb.) használtam fel.

Tudomásul veszem azt, hogy szakdolgozatomat/diplomamunkámat a Szegedi Tudományegyetem könyvtárában, a kölcsönözhető könyvek között helyezik el.

.....

aláírás

2014. 05.16.