

Katja Perdan<sup>1</sup>, Sergej Pirkmajer<sup>2</sup>

# Vpliv nevrotrofina NT-3 na funkcionalne sposobnosti motonevronov v kokulturi s človeško mišico<sup>3</sup>

*The Effect of Neurotrophin NT-3 on Functional Capabilities of Motoneurons in Cocultures with Human Muscle<sup>3</sup>*

---

## IZVLEČEK

**KLJUČNE BESEDE:** motorični nevroni – učinki zdravil, živčnomišični stik, živčni rastni faktorji

Nevrotrofini, med katere sodi tudi nevrotrofin 3 (NT-3), so beljakovine iz skupine rastnih dejavnikov z učinki na živčevje. Od vseh nevrotrofinov je NT-3 najbolj razširjen v razvijajočem se in zrelem živčnem sistemu in ima pomembno vlogo pri razvoju in ohranjanju strukture in delovanja živčevja, pomemben pa bi lahko bil tudi pri nekaterih nevroloških boleznih in v prihodnosti morda tudi pri njihovem zdravljenju. Namen naše naloge je bil preučiti vpliv NT-3 na zmožnost motonevronov, da tvorijo delujoče živčno-mišične stike. Pri tem smo se odločili uporabiti poskusni model, v katerem nevroni izraščajo iz eksplantov podganje embrionalne hrbtnjače in tvorijo delujoče živčno-mišične stike na mišičnih cevčicah človeške mišice. Ta model omogoča opazovanje nastajanja živčno-mišičnega stika na vseh pomembnih stopnjah tega procesa in kvantitativno ocenjevanje uspešnosti funkcionalnega oživčenja. Na tak način učinki NT-3 še niso bili kvantitativno ocenjeni. Vpliv NT-3 na funkcionalno oživčenje smo ocenjevali tako, da smo: 1. šteli živčne izrastke na robu eksplanta, 2. določali delež kontrakcijsko pozitivnih eksplantov, 3. šteli kontrahirajoče enote v polju oživčenja posameznega eksplanta in 4. šteli skupke acetilholinskih receptorjev v živčno-mišičnem stiku s pomočjo barvanja z  $\alpha$ -bungarotoksinom, konjugiranim z rodaminom. Pod vplivom NT-3, dodanega v koncentraciji 10 ng/ml, ki se je v poizkusih testiranja različnih koncentracij izkazala kot najbolj učinkovita, so se povečali vsi merjeni parametri funkcionalnega oživčenja. S tem smo potrdili hipotezo, da NT-3 izboljša zmožnosti motonevronov za ustvarjanje delujočih živčno-mišičnih stikov.

---

## ABSTRACT

**KEY WORDS:** motor neurons – drug effects, neuromuscular junction, nerve growth factors

Neurotrophins are a subgroup of growth factors acting within the nervous system. They are small proteins forming a family of several members. Among these, NT-3 is the most abundantly distributed within the developing and mature nervous system. NT-3 significantly contributes to the formation and maintenance of the nervous system and may be involved in various neurological diseases. In the future, it may also become a therapeutic agent for their treatment, therefore the mechanisms of its action are intensely investigated. The aim of our study was to investigate the effects of NT-3 on the ability of motor neurons to form

---

<sup>1</sup> Katja Perdan, štud med., Inštitut za patološko fiziologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, Zaloška 4, Ljubljana.

<sup>2</sup> Sergej Pirkmajer, štud med., Inštitut za patološko fiziologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, Zaloška 4, Ljubljana.

<sup>3</sup> Delo je bilo nagrajeno s fakultetno Prešernovo nagrado za študente leta 2004.

functional neuromuscular junctions. An *in vitro* experimental model in which neurons extending from rat spinal cord explants form functional neuromuscular junctions onto human myotubes has been employed for this purpose. The effects of NT-3 were quantitatively determined by 1) counting neuronal outgrowths from the spinal cord explants 2) determining the percentage of contraction-positive explants 3) counting the number of contracting units per explant and 4) counting the number of nicotinic receptor clusters at neuromuscular junctions using rhodamine-labelled  $\alpha$ -bungarotoxin. The statistical significance of differences between the treated and control groups of explants was tested using the independent samples Student t-test. NT-3 added to the culture medium at the concentration of 10 ng/ml, which proved the most efficient in our concentration testing, increased all the parameters of functional innervation. A higher capacity of the neurons to form functional neuromuscular junctions in NT-3-containing cocultures was thus demonstrated.

## UVOD

### Nevrotrofini

Nevrotrofini spadajo med rastne dejavnike z učinki na živčevje. V preteklosti se je ločevalo med rastnimi dejavniki in nevrotrofičnimi dejavniki, kar se ni izkazalo za uporabno, ker imajo rastni dejavniki tudi nevrotrofične učinke. Rastni dejavniki so beljakovine z zelo raznolikimi in kompleksnimi učinki. Spodbujajo proliferacijo in preživetje celic, sodelujejo pri pridobitvi in vzdrževanju celičnega fenotipa, vplivajo na sinaptično plastičnost, sproščanje živčnih prenašalcev, stabilnost in funkcionalnost sinaps, delovanje imunskega odziva in so udeleženi tudi pri vnetju (1). Do takšnih učinkov pripeljejo z vezavo na membranske receptorje, ki sprožijo zapletene znotrajcelične signalne poti. Spekter celic in tkiv, na katere delujejo, je zelo različen. Insulinu podobni rastni dejavnik I (IGF-I, angl. *insulin-like growth factor*) na primer deluje na številna tkiva in celice, nevrotrofini pa učinkujejo predvsem na živčevje in od tod izvira tudi njihovo ime. Družina nevrotrofinov ima močno konzervativno molekularno strukturo in vključuje šest članov: živčni rastni dejavnik (NGF, angl. *nerve growth factor*), ki je bil odkrit prvi, nevrotrofični dejavnik možganskega izvora (BDNF, angl. *brain-derived neurotrophic factor*), nevrotrofina 3 in 4/5 (NT-3, NT-4/5) ter nevrotrofina 6 in 7 (NT-6, NT-7), ki so ju našli le pri ribah (2, 3).

### Sinteza in izločanje nevrotrofinov

Nevrotrofini nastanejo najprej v obliki prepronevrotrofinov, ki se v endoplazemskem

retikulumu pretvorijo v pronevrotrofine. V Golgijevem aparatu ali sekrecijskem mešičku nastane zrel nevrotrofin, nakar se po dva od njih združita v dimer. Ta se kot biološko aktiven homodimer izloči po konstitutivni ali uravnavani poti (*za pregled glej 2*). Na sintezo nevrotrofinov vpliva sinaptična aktivnost. Blokada acetilholinskih receptorjev (AChR) s kurarejem privede v mišici do znižane sinteze NT-3 (4). Za nevrotrofični dejavnik glialnega izvora (GDNF, angl. *glial-derived neurotrophic factor*) so podobno *in vivo* ugotovili, da se njegova količina poveča v dejavnih mišicah in zniža v nedejavnih (5). Izražanje genov za nevrotrofine je tudi pod vplivom integrinov (6). Nevrotrofini se lahko izločajo po uravnavani ali po konstitutivni poti. Poglavitni mehanizem nadzorovanega izločanja je dvig koncentracije kalcija v celici (7), do katere lahko z depolarizacijo privedeta glutamat ali, v poskusnih razmerah, visoka zunajcelična koncentracija kalija (7, 8). Znano je tudi, da izločanje nevrotrofinov sprožijo z aktivacijo receptorjev Trk nevrotrofini sami, kar bi lahko igralo pomembno vlogo pri stabilizaciji sinaps (9). Izločene nevrotrofine lahko celice privzamejo in nato ponovno izločijo (*za pregled glej 2*).

### Molekularni mehanizmi delovanja nevrotrofinov

Nevrotrofini delujejo prek dveh vrst receptorjev: 1. družine Trk (tropomiozinu sorodna kinaza; angl. *tropomyosin-related kinase*) in 2. receptorja p75, ki spada v naddružino receptorjev za tumorje nekrotizirajoči dejavnik (TNF; tumorje nekrotizirajoči dejavnik; angl. *tumour necrosis factor*). Med receptor-

je Trk spadajo TrkA, TrkB in TrkC. Trk-receptorji so pri vezavi ligandov selektivni. Kot primarni ligand veže TrkA NGF, TrkB BDNF in NT-4/5 ter TrkC NT-3. NT-3 se kot edini nevrotrofin veže na vse receptorje, zato imajo živali z izbitim genom za NT-3 (*knock-out* živali) hujše posledice kot tiste z izbitim genom za njegov receptor TrkC (10). Specifičnost in afiniteta vezave nevrotrofinov na receptorje Trk se lahko spremenita pod vplivom p75 (11). Receptor p75 na primer inhibira vezavo NT-3 na TrkA, ki ga NT-3 v visokih koncentracijah sicer aktivira (12). NT-3 lahko celo nadomesti potrebe simpatičnih nevronov po NGF, če imajo mutiran p75 (13).

Vezavi nevrotrofina na receptor iz družine Trk sledita dimerizacija ter avtofosforilacija receptorja in temu sproženje znotrajceličnih signalnih poti, v katere so vključeni tudi MAPK (angl. *mitogen-activated protein kinase*), PI3K (angl. *phosphatidylinositide 3-kinase*) in PLC- $\gamma$ 1 (angl. *phospholipase C- $\gamma$ 1*) (za pregled glej 14, 15). Da nevrotrofin, ki ga izloči tarčno tkivo, privede do sprememb v genski ekspresiji pripadajočega nevrona, mora signal prepotovati razdaljo od živčnega končiča do jedra nevrona (t. i. retrogradno signaliziranje) (15). Po vezavi na receptor pride do internalizacije kompleksa ligand-receptor in nastanka »signalnih endosomov« (angl. *signaling endosomes*), ki potem potujejo z retrogradnim transportom proti telesu nevrona. Obstaja tudi obratna pot, po kateri potuje nevrotrofin z anterogradnim transportom od telesa nevrona do končiča, kjer se izloči in nato deluje parakrino ali avtokrino (za pregled glej 2). Z anterogradnim transportom lahko potuje tudi NT-3, npr. od mrežnice po njenih ganglijskih celicah do tektuma (16, 17).

Receptor p75 lahko uravnava delovanje receptorjev Trk, lahko pa tudi samostojno sproži znotrajcelične signalne poti (14). Raziskave kažejo na pomembno mesto p75 pri sproženju apoptoze (18). Raziskuje se tudi vloga p75 pri patogenezi stekline (19). Na p75 se lahko v nasprotju s selektivnejšimi receptorji Trk vežejo vsi nevrotrofini, zato ga imenujejo tudi »pannevrotrofinski receptor« (12). Poimenovanje p75 kot »receptor z nizko afiniteto« in TrkA kot »receptor z visoko afiniteto« (1, 19) po mnenju nekaterih ni ustrezno, ker imata tako TrkA kot tudi p75

manjšo disociacijsko konstanto od »mesta z visoko afiniteto«, ki nastane ob koekspresiji TrkA in p75 (11, 20).

Kot smo že omenili, so za učinkovanje nevrotrofinov pomembne tudi interakcije med p75 in Trk, do katerih prihaja: 1. na ravni samih receptorjev in 2. na ravni signalnih poti distalno od receptorjev. Signali, ki nastanejo ob aktivaciji Trk in p75, so lahko sinergistični ali antagonistični, zlasti v smislu sprožitve ali zavrtja programirane celične smrti (21), pri čemer je pomembna kombinacija receptorjev. Če na primer NGF, ki sicer omogoča preživetje (preko TrkA), v odsotnosti TrkA aktivira p75, povzroči apoptozo (22).

### Učinki nevrotrofinov

Nevrotrofini delujejo na različnih ravneh razvoja in delovanja nevronov. Levi-Montalcinijeva in Hamburger sta prva prišla do spoznanja, da na preživetje močno vplivajo tarčna tkiva. Kot povezovalni dejavnik med tarčnimi tkivi in preživetjem nevronov sta odkrila NGF. Ta spoznanja pa so dala osnovo t. i. »nevrotrofični hipotezi«. Po njej med razvojem nevroni tekmujejo za omejene količine nevrotrofičnih dejavnikov, ki jih proizvajajo tarčna tkiva. Ker teh dejavnikov ni dovolj za vse nevrone, se število prvotno nastalih nevronov med razvojem močno zmanjša (23, 24). Sposobnost nevrona, da se odziva na določen nevrotrofin, je pogosto odvisna od faze razvoja nevrona. Pluripotentne celice nevalne cevi so na primer v zgodnjih fazah razvoja odvisne od NT-3, ko začnejo vzpostavljati stik s tarčnim tkivom, pa postanejo odvisne od NGF (25). Specifično delovanje posameznih nevrotrofinov še vedno ni popolnoma dognano. Med razvojem lahko nevrotrofini delujejo na različnih stopnjah, od začetne diferenciacije, prek zorenja nevronov in programirane celične smrti, do propada nekaterih in stabilizacije drugih sinaps. Po končanem razvoju delujejo tudi na samo učinkovitost zrelih sinaps in sodelujejo pri obnavljanju ter vzdrževanju živčevja. V možganih odraslega se nevrotrofini v največji meri izražajo v hipokampusu (26) in so sprožilni dejavniki velikih sprememb v funkcionalni organizaciji možganske skorje med prelomnimi obdobji v razvoju in tudi kasneje (za pregled glej 27). Ena ključnih nalog nevrotrofinov je spodbujanje

izračanja aksonov in dendritov pri nevronih, ki so zanje občutljivi, verjetno pa imajo vlogo tudi pri morfološkem razvoju nevronov in usmerjanju njihove rasti (28–30). Podaljševanje aksonov pri perifernih nevronih kot tudi tistih v osrednjem živčevju je *in vitro* odvisno od nevrotrofinov, ni pa dovolj dokazov, da se to dogaja tudi v razmerah *in vivo* (31).

### **Vpliv nevrotrofinov na motonevrone**

Nevrotrofini so vpleteni v nastajanje in zorenje živčno-mišičnega stika (ŽMS), pri čemer je izrednega pomena pravilna interakcija med motonevroni in skeletnomišičnimi vlakni (27, 32). Kot zelo pomembnega na področju vzdrževanja učinkovitosti ŽMS izpostavljajo NT-4/5 (33). Nevrotrofini so pomembni za preživetje razvijajočih se in zrelih motonevronov, opisan pa je bil tudi njihov vpliv pri odzivu na poškodbo (34). Leta 1993 so prvič poročali o možnosti vpliva nevrotrofinov na sinaptični prenos med motonevromom in skeletnomišičnim vlaknom (35).

### **Vpliv nevrotrofinov na delovanje sinaps**

Odkritje, da imajo nevrotrofini akutne učinke na zrele nevrone in da vplivajo na učinkovitost sinaps, je vodilo v nadaljnje vrednotenje njihovega vpliva na dinamiko živčnega sistema. Pri dodajanju BDNF in NT-3 rezinam hipokampusa je prišlo do okrepitve sinaptičnega prenosa (36). Za NT-3 so ugotovili tudi, da potencira spontano in z akcijskim potencialom sproženo sinaptično aktivnost razvijajočega se ŽMS v kulturi (35).

## **NEVROTROFIN-3**

V možganih najdemo NT-3 v visokih koncentracijah v možganski skorji, hipokampusu, kjer so njegovi učinki na dolžino in razvejanost dendritov veliko večji kot učinki BDNF (37), talamusu in malih možganih; deluje pa tudi na hrbtenjačne motonevrone in je pomemben za oživčenje notranjega ušesa (23, 38). Periferno igra edinstveno vlogo pri razvoju propriocepcije in senzoričnih ganglijev. Pri mišjih homozigotih brez NT-3 so hrbtenjačna proprioceptivna aferentna vlakna, mišična vretena in Golgijevi kitni organi povsem odsotni (39). Med gangliogenezo pa so v sen-

zoričnih ganglijih z uporabo monoklonskih protiteles proti NT-3 ugotovili zmanjšanje števila celic za 30% (40).

### **Vpliv NT-3 na razvoj živčevja**

V zgodnji dobi razvoja živčevja je delovanje NT-3 pomembnejše kot delovanje ostalih nevrotrofinov. Kasneje vpliva ta dejavnik med drugim na preživetje Ia aferentnih živčnih vlaken in hitrost prevajanja po njih (41). NT-3 je pomemben tudi za razvoj in preživetje mehanoreceptorjev s počasno adaptacijo (42, 43). DiCiccio-Bloom in sodelavci so ugotovili vzpodbujevalen učinek NT-3 na proliferacijo simpatičnih nevroblastov (44). Poleg tega je NT-3 eden možnih kandidatov, ki naj bi vplivali na diferenciacijo holinergičnih nevronov simpatičnega živčevja. Pri poskusih na piščančjih simpatičnih ganglijih so namreč pod njegovim vplivom opazili izredno povečanje izražanja genov za holinergične označevalce (ChAT, angl. *choline acetyltransferase*; VIP, angl. *vasoactive intestinal polypeptide*) (45).

Ko so raziskovali, po katerih vzorcih poteka izražanje NT-3, so ugotovili, da se v času hitrega izračanja nevronskega izrastka močno izraža okoli ganglijskih nevronov, kjer verjetno deluje po avtokrinih in parakrinih mehanizmi. Med diferenciacijo celic in izračanjem aksonov proti tarčnim tkivom se njegovo izločanje poveča distalno, sinteza okoli ganglijev pa se istočasno močno zmanjša, kar pusti nevrone popolnoma odvisne od tarčnih tkiv (46). Včasih so menili, da nevrotrofini ne vplivajo na celice glije, vendar so Barres in sodelavci dokazali učinke NT-3 na preživetje prekursorskih celic oligodendrocitov tako *in vitro* kot tudi *in vivo* (47).

### **Učinki NT-3 na motonevrone in hrbtenjačo**

Motonevroni se v nasprotju z nevroni spinalnih ganglijev sami avtokrino ne morejo vzdrževati, poleg tega pa ne poznamo kombinacije nevrotrofičnih dejavnikov, ki bi preprečevala apoptozo zrelih motonevronov, izoliranih od vseh ostalih tipov celic (48). Za njihovo preživetje so bistvenega pomena interakcije z okoliškimi celicami. Odkritje nakazuje možnost, da zreli motonevroni potrebujejo podporo rastnih dejavnikov, ki se izločajo v hrbtenjači,

da so sploh sposobni uporabiti dejavnike, ki prihajajo iz periferije. Poznamo vsaj petnajst različnih dejavnikov, ki vplivajo na motonevrone, pri čemer učinek nekaterih lahko nadomestijo drugi (48). Študije kažejo, da je tudi NT-3 pomemben za preživetje izoliranih motonevronov podganje embrionalne hrbtnjače (49). NT-3 spodbuja diferenciacijo motonevronov v kulturah nevrnalne cevi (50). Ming in sodelavci pa so leta 1997 dokazali, da NT-3 močno vpliva tudi na dolžino izraščajočih aksonov hrbtnjačnih nevronov (28).

## NASTANEK ŽIVČNO-MIŠIČNEGA STIKA

### Izraščanje motonevronov proti tarčnim tkivom

Pri izraščanju iz nevrnalne cevi oziroma hrbtnjače vodijo aksoni negativni in pozitivni dražljaji iz okolja. Na koncu rastočega aksona se nahaja rastni stožec (angl. *growth cone*), ki jih s svojimi membranskimi receptorji sprejema in prevaja v znotrajcelične signale, ki vplivajo na citoskelet in s tem na smer in hitrost rasti aksona. Rastni stožec ima torej »senzorično« vlogo, ko prejema signale iz okolja, in »motorično«, ko ti privedejo do citoskeletnih sprememb (51). Poenostavljeno lahko rečemo, da pozitivni dražljaji spodbujajo rast nevrona in ga privlačijo, tako da akson potuje proti pravemu tarčnemu tkivu. Negativni dražljaji rast zavirajo in akson odbijajo ter tako preprečujejo, da bi prišel v napačno inervacijsko področje. NT-3 ima na primer akutne učinke na obračanje rastnih stožcev (28). Poleg tega se pod njegovim vplivom aksoni, rastoči iz spinalnih ganglijev, privlačijo, pod vplivom NGF pa odbijajo (29), skupaj pa na njihovo rast in usmerjanje ta dva nevrotrofina delujeta sinergistično (30). V ta proces so poleg rastnih dejavnikov vključene številne snovi, med njimi zunajcelični matriks (29) in integrini (51). Pomemben izvor rastnih dejavnikov so tarčna tkiva sama.

### Razvoj skeletne mišice in sinaptogeneza živčno-mišičnega stika

Skeletno mišičje se razvije iz paraksialnega mezoderma. Prvi znak miogeneze so podalj-

šana jedra in telesa mezenhimskih celic, ko se te diferencirajo v mioblaste. V procesu diferenciacije se enojedrne mioblasti združujejo v večjedrne, podaljšane, cilindrične mišične cevčice (mišični sincicij). Del mioblastov ostane na tej razvojni stopnji in se pozneje nahaja v tesnem stiku z mišičnim vlaknom (satelitske celice). Ker so se še vedno sposobne deliti, so pomembne pri obnavljanju mišičnega tkiva. Ko motorično vlakno, ki izvira iz istega segmenta, oživi mišično cevčico, nastane na tem mestu ŽMS, čemur sledi zorenje do končne oblike mišičnega vlakna. Preživetje in diferenciacija mišičnih cevčic sta med razvojem odvisna od prisotnosti motoričnih živcev in oživčenja z njihovimi končiči (52, 53).

Takoj po vzpostavitvi prvega stika med rastočim motonevromom in diferencirajočo se mišično cevčico pride do intenzivne izmenjave signalov med njima, kar omogoči nadaljnjo diferenciacijo in nastanek visoko specializirane strukture na tem mestu (za pregled glej 54). Med diferenciacijo pride do kopičenja AChR na postsinaptični membrani, povečanja učinkovitosti sproščanja acetilholina (ACh) in inhibicije rasti aksona. Pri tem je pomemben agrin (angl. *aggregation inducer*), ki se sintetizira v motonevronih (za pregled glej 55). Mesto nastanka ŽMS ni naprej določeno in se lahko pri vretenčarjih nahaja na vsej površini mišičnega vlakna. Za sinaptogenezo ŽMS vsebuje pomembne signale tudi bazalna lamina (56, 57). Z mišičnim vlaknom lahko sprva vzpostavi stik več končičev, vendar od vseh na koncu ostane le eden.

## KOKULTURE KOT POSKUSNI MODEL ZA ŠTUDIJ DEJAVNIKOV, KI VPLIVAJO NA NASTAJANJE ŽIVČNO-MIŠIČNEGA STIKA

Da bi lahko preučevali dogajanja v živem organizmu, je treba imeti za to primerne modele. Obstajajo tako *in vitro* kot tudi *in vivo* modeli, pri čemer so pri prvih možnosti opazovanja, kontrole in spreminjanja poskusnih pogojev veliko boljše. Tudi *in vitro* modeli so dveh vrst: 1. homologni, kjer so tkiva vzeta od iste vrste, in 2. heterologni, kjer izhajajo od različnih. Modele človeške mišice, oživčene *in vitro*, so vpeljali in uporabljali že v preteklosti (58–61).

Pri tem gre za heterologni model, kjer mišične cevčice, ki nastanejo iz satelitskih celic, pridobljenih po biopsiji človeške skeletne mišice, oživči motonevron, ki izraste iz eksplanta embrionalne podganje hrbtenjače. Če ne pride do oživčenja, človeška mišica v kulturi nikoli ne dozori do stopnje, potrebne za kontrahiranje, njena bazalna lamina in prečna progavost pa sta tudi slabo razviti (58, 62). V smislu njene uporabe kot poskusnega modela je to prednost, saj lahko kontrakcije, ki se pojavijo v kokulturi, pripišemo novonastalim ŽMS in tako spremljamo potek funkcionalnega oživčenja. Poleg tega lahko v tem sistemu opazujemo vse faze nastajanja funkcionalnega ŽMS, tudi prehod od začetne polinervacije do monoinervacije posameznih mišičnih vlaken. Potek oživčenja je primerljiv s tistim v *in vivo* razmerah. Intenzivno izraščanje aksonov iz eksplanta opazimo po 2 do 3 dneh kokulture (63). Po 7 do 10 dneh se pojavijo prve kontrahirajoče mišične cevčice, po 14 do 16 dneh pa število kontrahirajočih vlaken naraste, dobro vidna pa postane tudi njihova prečna progavost. Po 3 tednih so kontrakcije neprekinjene, kontrahirajoča vlakna pa morfološko bistveno drugačna od propadajočih nekontrahirajočih (58). Oživčeno mišico lahko v tem sistemu vzdržujemo tudi do 6 mesecev, kontrakcije pa lahko reverzibilno ustavimo z dodajanjem d-tubokurarina (64).

## NAMEN

Vloga nevrotrofinov pri razvoju, preživetju in obnavljanju živčevja je že vrsto let ena od osrednjih področij moderne nevroznanosti. Nevrotrofini bi lahko imeli vlogo tudi pri številnih nevroloških in drugih obolenjih, v prihodnosti pa mogoče tudi pri njihovem zdravljenju, zato je treba natančno raziskati njihove vplive v organizmu in mehanizme delovanja. Kot predmet naše raziskave smo izbrali vpliv NT-3 na zmožnost motonevronov, da tvorijo delujoče ŽMS. Kot poskusni model za te raziskave smo izbrali kokulture, v katerih motonevroni izraščajo iz eksplantov podganje embrionalne hrbtenjače in tvorijo delujoče ŽMS na mišičnih cevčicah človeške mišice. Ta model omogoča opazovanje vseh faz nastajanja ŽMS in kvantitativno ocenjevanje uspešnosti funkcionalnega oživčenja na vseh pomembnih stopnjah tega procesa.

V okviru naloge smo preverjali naslednjo hipotezo: NT-3 poveča sposobnost motonevronov za ustvarjanje funkcionalnih ŽMS. V preteklosti so se s podobnimi problemi že ukvarjali Braun in sodelavci (65), preliminarna študija vplivov nevrotrofičnih dejavnikov na funkcionalno oživčenje v opisanem poskusnem modelu pa je bila opravljena tudi v našem laboratoriju. Do zdaj pa še ni bila opravljena študija, kjer bi vplive NT-3 kvantitativno določali prek opisanih parametrov ob različnih fazah razvoja ŽMS.

## METODE

### Tretiranje živali in delo s človeškim tkivom

Raziskavo vpliva NT-3 na oživčenje mišičnih cevčic *in vitro* smo opravili na Inštitutu za patološko fiziologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Uporabili smo kokulture človeških mišičnih celic in eksplantov hrbtenjač podganjih zarodkov. Pri delu s človeškim tkivom smo upoštevali vse varnostne ukrepe, ki preprečujejo okužbe in njihovo širjenje. V poskusih smo uporabili koščke človeških mišic, ki se po doktrini odstranjujejo pri nekaterih operacijah na Ortopedski kliniki Kliničnega centra v Ljubljani. Za vse poskuse, ki smo jih izvedli, je bilo pridobljeno soglasje Komisije za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravje Republike Slovenije (dovoljenje številka 63/01/99). Podganje embrionalno tkivo smo izolirali iz zarodkov brejih samic soja Wistar. Pri delu smo upoštevali predpise, ki jih zahteva zakonodaja Republike Slovenije (Navodila o pogojih za izdajo dovoljenja za poskuse na živalih v znanstvenoraziskovalne namene, UL RS št. 322-03/85-74). Inštitut za patološko fiziologijo Medicinske fakultete ima dovoljenje za delo s poskusnimi živalmi: številka dovoljenja je 323-02-74/00. Poskusne živali smo žrtvovali v komorah z dovajanjem CO<sub>2</sub>. Posebno pozornost smo ves čas namenjali zmanjšanju njihovega trpljenja.

### Priprava kultur človeških mišic in njihovo oživčenje s podganjim živcem

V naši študiji smo uporabili nekoliko modificiran poskusni model človeške mišice, oživčene

*in vitro*. Gre za model, ki je bil v preteklosti že sam predmet številnih raziskav (za podrobnejši opis teh raziskav glej npr. 58, 60).

Kulturo človeških mioblastov smo pripravili po že utečenem postopku (60) iz satelitskih celic, ki smo jih izolirali iz mišičnega tkiva bolnikov, pri katerih ni bila ugotovljena nobena mišična oziroma živčno-mišična bolezen. V naši študiji smo kot vir satelitskih celic uporabili koščke mišice *abductor hallucis*, ki se po doktrini odstranijo pri operacijah ekvinovarus. Tkivo smo pred obdelavo hranili največ en teden v 15 ml rastnega medija z minimalno sestavo (MEM) (Gibco, Maryland, ZDA) z dodanim 15% serumom govejega fetusa (FBS) (Gibco, Maryland, ZDA) ( $T = 4^{\circ}\text{C}$ ). Mišice smo pred pripravo celičnih kultur očistili vezivnega in maščobnega tkiva pod disekcijsko lupo in jih narezali na približno 0,5 mm velike koščke s skalpelom #10 in pinceto #7. Vse uporabljeno orodje je bilo pred uporabo avtoklavirano, posode sterilne, poleg tega pa smo upoštevali načela aseptičnega dela. Pripravljene koščke smo s Pasteurjevo pipeto prenesli v stekleničko z magnetnim mešalom in tripsinom (10 ml,  $T = 37^{\circ}\text{C}$ ). Vse skupaj smo postavili v vodno kopel in na mešalno ploščo, pri čemer je bil čas postopka odvisen od količine tkiva (običajno 45 min). Po končani tripsinizaciji smo koščke prenesli v 15 ml posodo (Falcon, Becton Dickinson & Company, Nemčija) in dodali 2 ml MEM, s čimer smo ustavili tripsinizacijo. Sledilo je 5-minutno centrifugiranje pri 1000 obratih, nakar smo supernatant posrkali, celice pa raztopili v MEM (3 ml) in jih prenesli v petrijevke ( $d = 100\text{ mm}$ ). Pridobljene mišične satelitske celice smo gojili do klonalne gostote v MEM (5 ml) z dodanim 15% serumom govejega fetusa (FBS) v inkubatorju z nasičeno vlago ( $T = 37^{\circ}\text{C}$ ) in 5%  $\text{CO}_2$ . Po 2 do 3 tednih rasti brez menjave medija smo pred fuzijo mioblastov v mišične cevčice ločili mioblastne kolonije od fibroblastnih. Osnova za ločevanje so bile morfološke razlike med obema tipoma celic. Iz petrijevke smo posrkali medij in na kolonije, ki smo jih označili kot mioblastne, postavili sterilne obročke. Le-te smo prej postavili v avtoklavirano silikonsko mast. V nameščene obročke smo dali 2-3 kapljice tripsina in opazovali celice pod mikroskopom, dokler niso odstopile od podlage. Disociirane

celice smo pobrali z dolgo Pasteurjevo pipeto in jih prenesli v posodo za celične kulture (200 ml). Ko so se celice primerno zgostile, smo jih še pred fuzijo v mišične cevčice tripsinizirali in prenesli v posode ( $d = 35\text{ mm}$ ) z vstavljenim krovnim stekelcem. Krovna stekelca smo pred tem prevlekli z mešanico želatine (Sigma, Missouri, ZDA) in krvne plazme v razmerju 1:2. Mioblasti so rasli v mediju F-14 (Gibco, Maryland, ZDA) z dodanim 10% FBS, fibroblastnim rastnim dejavnikom (FGF) (50 ng/ml medija), epidermalnim rastnim dejavnikom (EGF) (10 ng/ml medija) (oba rastna dejavnika sta bila proizvod Sigma, Missouri, ZDA) in insulinom (10  $\mu\text{g/ml}$  medija) (Sigma, Missouri, ZDA). Po fuziji mioblastov v mišične cevčice smo na kulturo položili do 1 mm debele segmente podganje hrbtenjače, izolirane iz zarodkov (stopnja E13 do E14), z intaktnimi možganskimi ovojnicami in spinalnimi gangliji. Na vsako krovno stekelce smo v ustreznih razmakih položili 4 do 5 segmentov embrionalne podganje hrbtenjače. Nadaljnjo diferenciacijo mioblastov smo vzpodbudili s spremembo sestave medija F-14 z dodanim 5% FBS in insulinom (10  $\mu\text{g/ml}$  medija); v tem mediju ni bilo rastnih dejavnikov. Kokulture smo razdelili na testne in kontrolne. Kontrolnim smo dodali le medij F-14 s spremenjeno sestavo, testnim pa poleg tega še nevrotrofični faktor NT-3 (R & D Systems, Minnesota, ZDA). V prvem, testnem poskusu smo preizkusili 5 različnih koncentracij (1, 5, 10, 20, 50 ng/ml medija), v nadaljnjih pa smo uporabili koncentracijo 10 ng/ml medija, ki se je v testnem poskusu izkazala kot najučinkovitejša. Medij smo vsem kokulturam menjavali vsake tri dni.

### **Kvantitativno vrednotenje funkcionalnega oživčenja v kokulturah**

Izraščanje nevronov iz eksplantov hrbtenjače in nadaljnje faze v procesu funkcionalnega oživčenja smo ocenjevali prek štetja: 1. izrastkov na obodu eksplanta, 2. kontrahirajočih enot na posameznem eksplantu, 3. kontrakcijsko pozitivnih eksplantov in 4. skupkov AChR; slednje smo pred tem obarvali s fluorescenčno (rodamin) označenim  $\alpha$ -bungarotoksinom. Štetje izrastkov, kontrahirajočih enot in kontrakcijsko pozitivnih eksplantov smo opravili

ob različnih dnevih (3., 5., 7., 9., 11. in 13. dan kokulture), in tako spremljali učinke NT-3 na funkcionalno oživčenje v posameznih fazah razvoja kokultur. Del kokultur smo 14. dan pripravili za opazovanje skupkov AChR. Od tretjega dneva kokultur dalje smo vsak drugi dan, vse do trinajstega dne, ko je proces funkcionalnega oživčenja v teh kokulturah v glavnem končan, opazovali kokulture pod invertnim mikroskopom (Zeiss, Jena, Nemčija) in šteli živčne izrastke, ki so od eksplantov rasli proti mišičnim cevčicam. Izrastke smo šteli neposredno ob robu eksplanta in pri tem nismo upoštevali distalnih razvejitev izrastkov ter morfoloških razlik med njimi. Eksplante, ki v času trajanja poskusa niso dobili niti enega izrastka, smo iz nadaljnje obdelave izločili. Prav tako smo izločili eksplante, ki so pred koncem poskusa odstopili od podlage oziroma propadli.

Med poskusom smo hkrati z izrastki opazovali tudi kontrakcije mišičnih cevčic. Skupine cevčic v bližini določenega eksplanta, ki so sodile v področje oživčenja tega eksplanta in so se krčile sočasno z enako frekvenco (ki se je razlikovala od frekvence krčenja mišičnih cevčic v okolici) ter so ležale znotraj enega vidnega polja (100-kratna povečava), smo obravnavali kot eno kontrahirajočo enoto. Eksplant, ki je imel v svojem področju oživčenja vsaj eno kontrahirajočo enoto na dan opazovanja, smo opredelili kot kontrakcijsko pozitiven eksplant.

Skupke AChR smo barvali z  $\alpha$ -bungarotoksinom, označenim s fluorescenčnim barvilom rodamin (Molecular Probes, Oregon,

ZDA). Barvanje smo izvedli 14. dan poskusa. Rastnemu mediju smo dodali  $\alpha$ -bungarotoksin v končni koncentraciji  $10^{-8}$  mol/l in v takšnem mediju inkubirali kokulture 30–60 min pri  $37^\circ\text{C}$ . Sledilo je spiranje kokultur z EBSS (Earle's Balanced Salt Solution) (EBSS, Gibco, Maryland, ZDA) in 15-minutna fiksacija s 4 % paraformaldehidom (Sigma, Missouri, ZDA) v fosfatnem pufru pri  $37^\circ\text{C}$ . Preparate, obdelane po opisanih postopkih, smo fotografirali na Zeissovem mikroskopu Axioskop z ustreznimi filtri za UV-svetlobo. Pri mikroskopiranju smo uporabili od 200 do 1000-kratno povečavo. Skupke smo šteli v štirih vidnih poljih okoli vsakega eksplanta pri 400-kratni povečavi. Rezultate smo izražali kot število skupkov AChR na mikroskopsko vidno polje.

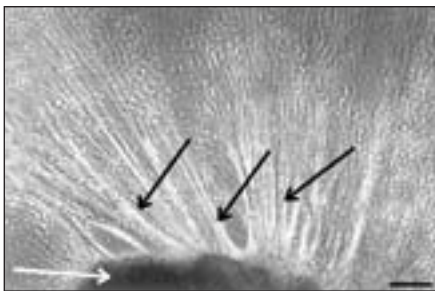
### Statistične metode

Za statistično obdelavo smo uporabili program SPSS Version 10 (SPSS Inc., Chicago, IL, ZDA). Statistično značilnost razlik med testnimi in kontrolnimi skupinami smo ugotavljali s Studentovim t-testom za neodvisne vzorce. Kot statistično značilne smo obravnavali razlike takrat, kadar je bil p enak ali manjši od 0,05.

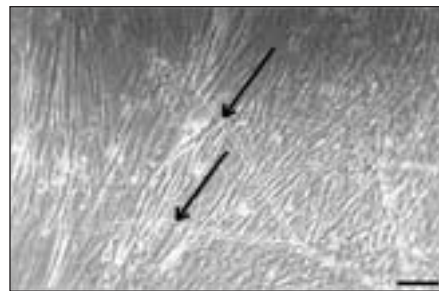
## REZULTATI

### Rast živčnih izrastkov in tvorba funkcionalnih živčno-mišičnih stikov

Na robovih eksplantov podganje embrionalne hrbtenjače (v nadaljevanju eksplant) smo



Slika 1. Fazno-contrastna slika 7 dni stare kokulture človeških mišičnih cevčic in eksplanta podganje embrionalne hrbtenjače. Na sliki je viden eksplant (bela puščica) s številnimi izrastki na obodu (črne puščice). Vidne so tudi distalne razvejite izrastkov. Merilo je  $100\ \mu\text{m}$ .



Slika 2. Fazno-contrastna slika 14 dni stare kokulture človeških mišičnih cevčic in eksplanta podganje embrionalne hrbtenjače. Pri-kazan je razvejan živčni izrastek (črni puščici) v stiku z mišičnimi cevčicami. Merilo je  $20\ \mu\text{m}$ .

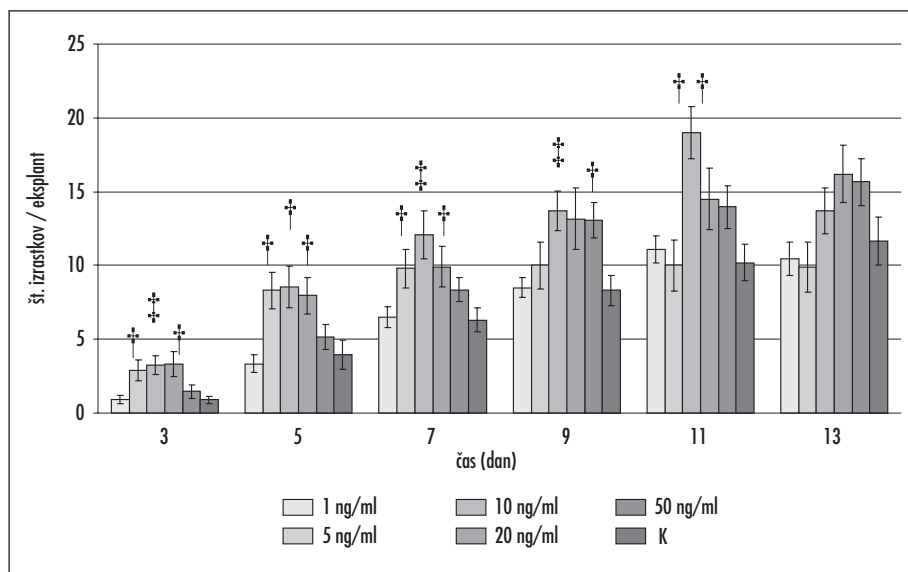


3. dan opazili nežne, kratke izrastke, ki so rasli proti mišičnim cevčicam. S časom je naraščalo njihovo število, posamezni izrastki pa so postajali daljši in debelejši (slika 1). Distalno so se razvejili, tako da so tako nastali živci tvorili 9. in 11. dan gosto mrežo. Ko so izrastki s svojimi končiči dosegli mišične cevčice (slika 2), so tvorili ŽMS, kar smo lahko opazovali kot krčenje mišičnih cevčic. V prvih dneh opazovanja so se krčile le posamezne mišične cevčice, kasneje pa so nastale večje in številnejše kontrahirajoče enote.

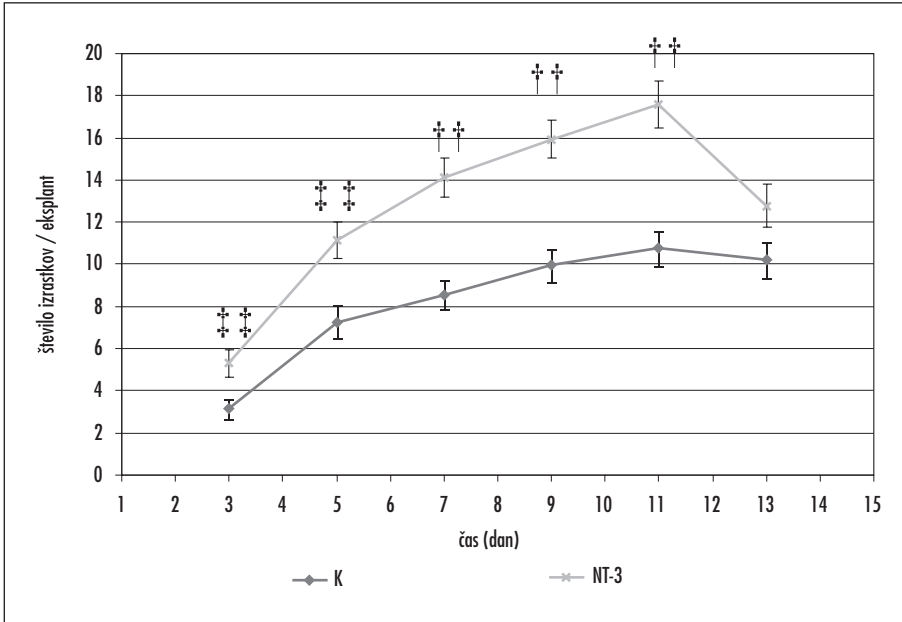
### Vpliv različnih koncentracij NT-3 na število živčnih izrastkov

Ker iz tehničnih razlogov naših raziskav nismo mogli razširiti na ugotavljanje koncentracijske odvisnosti učinkov NT-3 na prej opisane parametre funkcionalnega oživčenja, smo na začetku študije opravili poskus, v katerem smo skušali oceniti, pri kateri koncentraciji lahko v nadaljevanju pričakujemo najbolj izražene učinke NT-3. Kvantitativno smo vpliv različnih koncentracij NT-3 vrednotili na podlagi

števila živčnih izrastkov iz eksplantov. Da bi število izrastkov ocenili čim bolj objektivno in na enak način skozi celoten poizkus, smo jih šteli le neposredno ob robu eksplanta, ne da bi pri tem upoštevali njihove medsebojne morfološke razlike ali število distalnih razvejitev. Dobljene vrednosti smo izražali kot število živčnih izrastkov na eksplant. Uporabljene koncentracije NT-3 so bile 1, 5, 10, 20 in 50 ng/ml, kokulturam pa smo ga dodajali od 3. dneva naprej vsak tretji dan. Vpliv NT-3 je bil najbolj izrazit pri koncentracijah 10, 20 in 50 ng/ml (slika 3). Po 11 dneh je bilo v kokulturah, v katerih je bil prisoten NT-3 v koncentraciji 10 ng/ml, 90 % več izrastkov kot v kontrolnih kokulturah, pri kokulturah, ki smo jih tretirali z NT-3 v koncentracijah 20 ng/ml in 50 ng/ml NT-3, pa 40 % več. Kokulture, ki so bile izpostavljene NT-3 v koncentraciji 1 ng/ml, se od kontrolnih statistično značilno niso razlikovale ( $p > 0,05$ ). Pri eksplantih, tretiranih z 10 ng/ml NT-3, je bilo 11. dan 71 % več izrastkov kot pri tretiranih z 1 ng/ml ( $p < 0,001$ ), 90 % več kot pri tretiranih s 5 ng/ml ( $p < 0,005$ ) in 36 % več kot pri



Slika 3. Vpliv različnih koncentracij NT-3 na število izrastkov na eksplant. Prikazane so povprečne vrednosti števila živčnih izrastkov na eksplant  $\pm$  standardna napaka. Število analiziranih eksplantov N je bilo pri posameznih koncentracijah naslednje: 1 ng/ml (N = 20); 5 ng/ml (N = 20); 10 ng/ml (N = 23); 20 ng/ml (N = 20); 50 ng/ml (N = 20). V kontrolnem poskusu je bil N = 20. Na abscisi so podani dnevi kokulture, torej dnevi po času, ko smo na kulture mišic položili eksplante podganje embrionalne hrbtnjenjače. K – kontrola. Statistično značilne razlike (Studentov t-test) v primerjavi s kontrolo so označene z † ( $p < 0,05$ ), †† ( $p < 0,001$ ) in ††† ( $p < 0,005$ ).

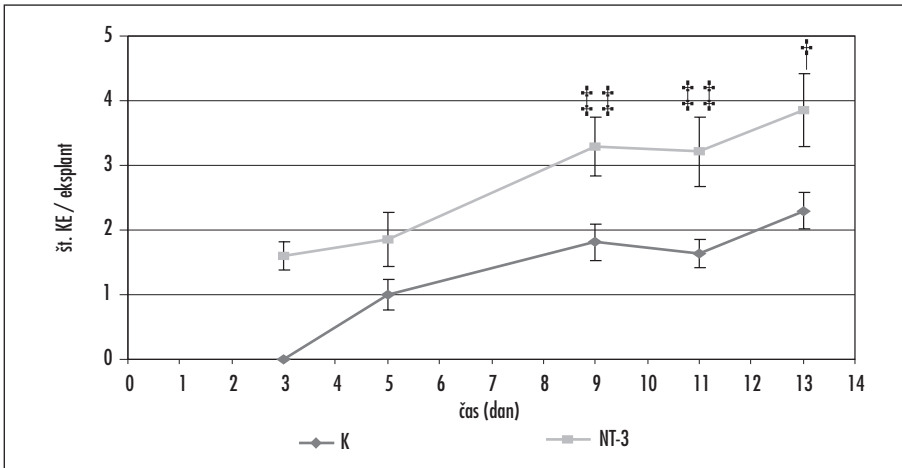


Slika 4. Vpliv NT-3 na število izrastkov na posamezen eksplant. Prikazane so povprečne vrednosti treh neodvisnih poskusov  $\pm$  standardna napaka. Število analiziranih eksplantov (N) je bilo v kontrolnem in testnem poskusu (NT-3 v koncentraciji 10 ng/ml) enako (N = 63). Statistično značilne razlike (Studentov t-test) v primerjavi s kontrolo so označene z † † (p < 0,01) in † † † (p < 0,001). Po 13 dneh razlike niso bile več statistično značilne (p > 0,05). Na abscisi so podani dnevi kokulture. K – kontrola.

348

tretiranih s 50 ng/ml (p < 0,05). Razlika med koncentracijama 10 in 20 ng/ml po 11 dneh statistično ni bila značilna (p > 0,05). Ker je

bil učinek NT-3 najmočnejše izražen pri koncentraciji 10 ng/ml, smo ostali del študije izvedli pri tej koncentraciji.



Slika 5. Vpliv NT-3 na število kontrahirajočih enot v področju oživčenja posameznega kontrakcijsko pozitivnega eksplanta. Prikazane so povprečne vrednosti dveh neodvisnih poskusov  $\pm$  standardna napaka. NT-3: (N = 28); kontrola: (N = 27); N – število kontrakcijsko pozitivnih eksplantov. Statistično značilne razlike (Studentov t-test) v primerjavi s kontrolo so označene z † (p < 0,05) in † † (p < 0,01). KE – kontrahirajoča enota, K – kontrola. 5. dan razlika ni statistično značilna (p > 0,05). Na abscisi so podani dnevi kokulture. Koncentracija NT-3 je bila 10 ng/ml.

### Vpliv NT-3 na število živčnih izrastkov ob različnih časih kokulture

Primerjava števila izrastkov pri kontrolnih kokulturah in pri kokulturah, izpostavljenih NT-3 v koncentraciji 10 ng/ml NT-3, je pokazala, da je od 3. do 11. dneva vpliv NT-3 na število izrastkov statistično značilen. Največji prirastek izrastkov pod vplivom NT-3 je bil med 3. in 5. dnevom, po 11. dnevu pa je število izrastkov upadlo in vpliv NT-3 ni bil več statistično značilen. Po 11 dneh, ko je bilo izrastkov največ tako pri tretiranih kot tudi pri kontrolnih kokulturah, je bilo število izrastkov pod vplivom NT-3 za 70% večje kot pri kontrolni skupini (slika 4).

### Vpliv NT-3 na število kontrahirajočih enot ob različnih časih kokulture

Prve kontrakcije so bile v kokulturah, ki so bile tretirane z NT-3, opazne že 3. dan in torej pred časom, ko so bile le-te opazne v kontrolnih kokulturah (slika 5). Med kokulturami, ki smo jim dodali NT-3 (10 ng/ml), in kontrolnimi kokulturami je bila razlika v številu kontrahirajočih enot (KE) na eksplant stati-

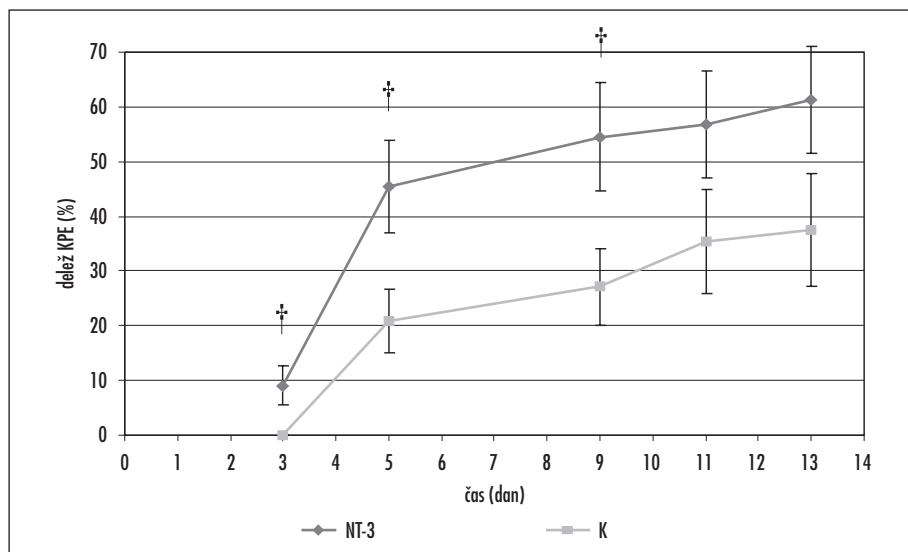
tično značilna od 9. dne dalje (slika 5). Ta razlika je bila največja 11. dan, ko se je pod vplivom NT-3 število KE povečalo kar za 100%. V povprečju se je pri tretiranih eksplantih število KE ob dnevih opazovanja povečalo za 84%.

### Vpliv NT-3 na delež kontrakcijsko pozitivnih eksplantov ob različnih časih kokulture

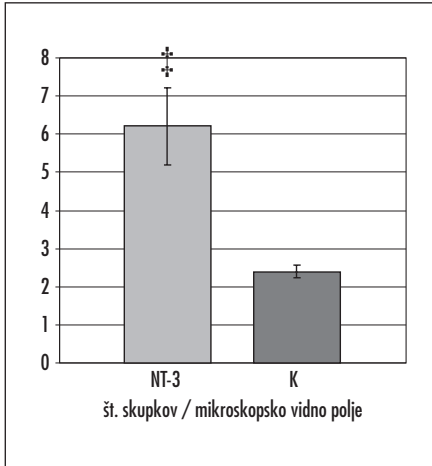
Izračunali smo tudi delež eksplantov, ki so bili na dan opazovanja kontrakcijsko pozitivni. Največji porast le-teh smo ugotovili v obdobju med 3. in 5. dnevom poskusa. Razlika med srednjimi vrednostmi tretiranih in kontrolnih eksplantov je bila ves čas prisotna in je bila največja 5. dan, ko je bil delež kontrakcijsko pozitivnih eksplantov (KPE) pod vplivom NT-3 2,2-krat večji (slika 6). V povprečju se je delež KPE pod vplivom NT-3 ob dnevih opazovanja povečal za 85%.

### Vpliv NT-3 na število skupkov AChR

Skupke AChR, obarvane z  $\alpha$ -bungarotoksinom, smo opazovali 14. dan kokulture. Šteli



Slika 6. Vpliv NT-3 na delež kontrakcijsko pozitivnih eksplantov. Prikazane so povprečne vrednosti dveh neodvisnih poskusov  $\pm$  standardna napaka. NT-3: (N = 44); kontrola: (N = 48). N – število eksplantov, KPE – kontrakcijsko pozitiven eksplant. Na abscisi so podani dnevi kokulture. Koncentracija NT-3 je bila 10 ng/ml. Statistično značilne razlike (Studentov t-test) glede na kontrolo so označene z † ( $p < 0,05$ ). 11. in 13. dan razlika statistično ni značilna ( $p > 0,05$ ).



Slika 7. Vpliv NT-3 na število skupkov AChR na mikroskopsko vidno polje. Prikazane so povprečne vrednosti dveh poskusov  $\pm$  standardna napaka. NT-3: (N = 14); kontrola: (N = 10), (N = število analiziranih eksplantov). Analizo smo opravili 14. dan kokulture. Koncentracija NT-3 je bila 10 ng/ml. Razlika med testno (NT-3) in kontrolno (K) skupino je statistično značilna (Studentov t-test,  $p < 0,005$ ) in je označena z †.

smo jih v štirih vidnih poljih okoli kontrakcijsko pozitivnega eksplanta pri 400-kratni povečavi. Dobljene vrednosti so izražene kot število skupkov na mikroskopsko vidno polje. Pri eksplantih, ki so bili izpostavljeni NT-3, je število skupkov po 14 dneh 2,6-krat večje kot pri kontrolnih eksplantih (slika 7). V vidnih poljih okoli eksplantov, ki v času poskusa nikoli niso bili kontrakcijsko pozitivni, skupkov nismo našli. Skupke smo opazovali le 14. dan, ker bi, če bi hoteli spremljati časovno odvisnost tudi na tej ravni, potrebovali veliko več eksplantov in bi bilo zato treba žrtvovati veliko več poskusnih živali. Poleg tega v zgodnjih fazah kokulture skupki še niso jasno razmejeni do okolice kar močno otežuje njihovo štetje.

## RAZPRAVLJANJE

V naših poskusih smo ugotovili, da NT-3 poveča število izrastkov in izboljša funkcionalno oživčenje človeške skeletne mišice v vseh preiskovanih fazah tega procesa; pod vplivom NT-3 se je povečalo število kontrahirajočih enot, delež kontrakcijsko pozitivnih eksplantov in število skupkov AChR.

## Vpliv NT-3 na število izrastkov iz eksplanta hrbtnjače

Vpliv NT-3 v koncentraciji 10 ng/ml na število izrastkov (1,9-kratno povečanje po 11 dneh) je bil v našem poskusu primerljiv z rezultati Brauna in sodelavcev (2-kratno povečanje po 15 dneh; (65)) in Marša (1,8-kratno povečanje po 15 dneh (66)). Povečano število izrastkov bi lahko pripisali večjemu preživetju nevronov in/ali večjemu in hitrejšemu izražanju živčnih izrastkov, kar so znani učinki nevrotrofinov (28, 31, 49, 67). V nadaljevanju opisanih poskusov bi bilo možno kvantitativno ovrednotiti oba učinka. Preživetje nevronov bi lahko na primer vrednotili z označevanjem apoptotičnih celic v tretiranih in kontrolnih eksplantih. Rast izrastkov pa bi lahko ocenjevali z večkratnimi zaporednimi meritvami njihove dolžine, kot so to storili Braun in sodelavci (65).

Problem, s katerim smo bili soočeni ob štetju izrastkov, je, da so izrastki morfološko izredno raznoliki, tako po dolžini, debelini, številu razvejitev kot tudi uspešnosti vzpostavitve stikov z mišičnimi cevčicami. Nekateri se v času opazovanja niti niso približali mišičnim cevčicam. Da bi kljub tem težavam izrastke šteli v vseh poskusih na enak način, smo na začetku poskusov opredelili morfološka merila, ki so morala biti izpolnjena, da je bila opazovana struktura prepoznana kot izrastek, in nato ta merila dosledno upoštevali v celotni študiji. Opazili smo tudi, da so imeli nekateri eksplanti, tako tretirani kot kontrolni, izrazito več izrastkov kot drugi, kar bi lahko pripisali večjemu številu nevronov v regijah, od koder so bili eksplanti izolirani. Ta problem bi lahko omilili tako, da bi vedno uporabili le eksplante ene same regije hrbtnjače, vendar bi to zahtevalo žrtvovanje bistveno večjega števila živali, kar v okviru naše naloge ni bilo izvedljivo.

Pri štetju izrastkov ni bilo mogoče ločevati motonevronov od drugih nevronov, ki so izraščali iz hrbtnjačnega eksplanta in ki so bili prav tako izpostavljeni NT-3. Pri našem štetju smo torej predpostavili, da ima NT-3 približno enake učinke na vse nevrone, ki izraščajo iz eksplanta, kar po drugi strani pomeni, da bi bil v primeru, ko bi se vplivi NT-3 na izražanje motonevronov izrazito razlikovali od tovrstnih vplivov na druge nevrone,

naš pristop lahko vprašljiv. Po podatkih iz literature lahko sklepamo, da temu ni tako in da ima NT-3, v primerjavi z drugimi nevrotrofini, dokaj široke in neselektivne učinke na različne tipe nevronov v osrednjem živčevju (1), pa tudi na celice glije (41, 68), kar upravičuje naš pristop. Hari in sodelavci (29) so v svoji študiji ugotovili, da 50 ng/ml NT-3 vpliva na izražanje aksonov senzoričnih ganglijev tako, da ti rastejo drug proti drugemu in se prepletajo. Znano je tudi, da aksoni senzoričnih nevronov spinalnih ganglijev kažejo usmerjeno rast, če so izpostavljeni kontrakcijskemu gradientu NT-3 v kombinaciji z NGF (80 ng/ml/mm) (30), in da NT-3 pozitivno vpliva na njihovo preživetje (40). NT-3 ima učinke tudi na nevrone simpatičnih ganglijev, ki imajo mesta z visoko afiniteto za vezavo NT-3 (69). Pred kratkim so ugotovili, da NT-3, ki pripotuje v hrbtenjačo z retrogradnim transportom po motonevronih, sproži izražanje nevronov poškodovanega kortikospinalnega trakta v tem predelu hrbtenjače (70). Drugačne in bolj selektivne učinke kaže na primer NGF. Ta nevrotrofin tudi pozitivno vpliva na število izrastkov v kokulturi eksplantov podganje hrbtenjače in človeških mišic, nima pa nobenega vpliva na parametre, ki odražajo funkcionalno oživčenje mišičnih celic *in vitro*, kot je na primer število skupkov AChR (65), ker povečano število izrastkov ni posledica njegovih učinkov na motonevrone, temveč senzorične nevrone. Zaključimo torej lahko, da je v primeru NT-3 štetje izrastkov iz eksplanta hrbtenjače zelo verjetno primeren pokazatelj njegovih vplivov na izražanje motonevronov, s stoddotno gotovostjo pa tega ne moremo trditi. Pri interpretaciji teh rezultatov je torej potrebna previdnost, še posebej, ker ne vemo, ali je odnos med številom izrastkom in izražanjem motonevronov linearen.

Zaradi tehničnih ovir nismo mogli natančneje preučevati koncentracijske odvisnosti učinkov NT-3 na izražanje aksonov in funkcionalno oživčenje pri različnih koncentracijah. Te vplive so sicer že obravnavali drugi (65, 66). Braun in sodelavci so preizkušali vplive NT-3 v koncentracijah 1 pg/ml, 0,1, 1, 10 in 100 ng/ml, Marš pa 1, 5, 10, 20 in 50 ng/ml. Prvi so ugotovili statistično značilen vpliv na število izrastkov pri 10 in 100 ng/ml, Marš pa pri vseh testiranih koncentracijah s stopnjevanjem

učinkov od 1 ng/ml NT-3 do 20 ng/ml NT-3, pri čemer so učinki pri koncentracijah nad 5 ng/ml izrazito močnejši. Zaradi opisanih razlik in zato, ker v teh šudijah niso preučevali časovne odvisnosti učinkov NT-3, smo se odločili v preliminarnem poskusu določiti tisto koncentracijo, ki bi imela tudi v modelu, ki upošteva časovno odvisnost učinkov, najbolj izražene učinke. Na podlagi primerjave naše študije z omenjenima sklepamo, da dosežejo učinki NT-3 na rast izrastkov in funkcionalno oživčenje *in vitro* vrh pri koncentracijah 10–20 ng/ml, pri višjih in nižjih koncentracijah pa ta učinek upada. Malenkostne razlike v rezultatih med našimi in prejšnjimi študijami bi lahko izvirale tudi iz različnih časov merjenj. Braun s sodelavci in Marš so ocenjevali število izrastkov po petnajstih dneh, torej v času, ko smo mi poskus že zaključili. Vprašanje je tudi, kako vpliva heterolognost modela na učinke rekombinantnega NT-3, oziroma, ali bi lahko pričakovali enake rezultate pri uporabi homoložnih humanih kokultur. Že Ming in sodelavci so se spraševali, ali so učinki humanega rekombinantnega NT-3 na Trk-receptorje nevronov druge *species*, v njihovem primeru *Xenopus* spp., lahko optimalni (28).

### Vpliv NT-3 na ostale parametre funkcionalnega oživčenja

Vpliv rastnih dejavnikov na izražanje živčnih izrastkov iz hrbtenjače so že preučevali tudi drugi avtorji. Ta parameter pa ne pove veliko o možnostih motonevronov za tvorbo funkcionalnih ŽMS, zato je bilo treba za tovrstne študije uvesti druge parametre. Braun s sodelavci (65) je funkcionalno oživčenje ocenjeval prek štetja skupkov AChR in ugotovil značilne učinke NT-3 pri koncentracijah, višjih od 1 ng/ml, ki je bila hkrati koncentracija z najmočnejšim učinkom. V preteklih poskusih v našem laboratoriju, kjer smo ugotavljali vplive raznih nevrotrofinov na funkcionalno oživčenje, smo uvedli model *in vitro* oživčenih mišičnih cevčic in zanj ugotovili, da omogoča poleg štetja skupkov AChR tudi uporabo dveh novih parametrov: deleža kontrakcijsko pozitivnih eksplantov in števila kontrahirajočih enot na eksplant (60). Marš je v tem modelu tudi že ugotovil, da je vpliv NT-3 na te parametre najvišji pri 20 ng/ml NT-3 (66).

V naši študiji vplivov NT-3 smo ocenjevali vse tri omenjene parametre funkcionalnega oživčenja v različnih časovnih obdobjih.

Ko smo v našem testnem poskusu izbrali koncentracijo NT-3, pri kateri bi bili njegovi učinki najbolj izraženi, smo kot merilo izbrali število izrastkov na eksplant embrionalne hrbtnjače. Treba je upoštevati možnost, da uporabljena koncentracija 10 ng/ml ni nujno tista, ki bi najmočneje vplivala na sinaptogenezo ŽMS. Ta pomislek utemeljujejo tudi študije Brauna in sodelavcev (65), ki so najmočnejši učinek na število skupkov AChR, dosegli pri 1 ng/ml NT-3, torej pri koncentraciji, ki na število živčnih izrastkov v njihovih poskusih (kot tudi v našem) sploh ni imela statistično značilnega vpliva (65). Vendar je tudi v tej študiji NT-3 v koncentraciji 10 ng/ml imel značilen učinek na število skupkov AChR. Poleg tega je ta koncentracija NT-3 imela najmočnejši učinek na dolžino izrastkov in globalno inervacijsko površino (65).

Ker človeška mišična vlakna nikoli spontano ne kontrahirajo, temveč le, če so oživčena, smo večje število kontrahirajočih enot pri tretiranih kokulturah obravnavali kot odsev večjega števila novonastalih funkcionalnih ŽMS. Naši rezultati so primerljivi s študijo Marša in sodelavcev, ki so leta 2001 na enakem modelu brez dodanih rastnih dejavnikov preučevali diferenciacijo celic glije in motonevronov med nastajanjem ŽMS. Ugotovili so, da se prve kontrakcije v kokulturi pojavijo 7. dan in da njihovo število narašča do 17. dneva (60). V naši študiji smo pod vplivom NT-3 ugotovili prve kontrakcije že po 3 dnevih kokultur, kar pomeni, da NT-3 v zgodnjem obdobju sinaptogeneze ŽMS pospeši nastajanje ŽMS in hkrati poveča število nastalih ŽMS. To pa bi bila lahko posledica 1. večjega števila izrastkov kot posledica večjega preživetja motonevronov in/ali 2. večjega števila izrastkov, ki so dosegli mišične cevčice, kot posledica spodbujevalnega učinka NT-3 na njihovo rast in/ali 3. pozitivnega učinka NT-3 na samo sinaptogenezo ŽMS.

Na tem mestu velja omeniti tudi tehnične težave, na katere smo naleteli pri štetju kontrahirajočih enot. Samo štetje mora biti hitro, ker podhlajene mišične cevčice prenehajo kontrahirati, kontrakcije pa se včasih ne povrnejo več. To bi lahko preprečili z uporabo

mikroskopa, ki bi imel ogrevano mizico. Nadaljnji problem je, da se vse enote nikoli ne krčijo hkrati v danem trenutku, zato lahko posamezne v času opazovanja mirujejo. Poleg tega so si včasih frekvence krčenja kontrahirajočih enot zelo podobne in je težko zanesljivo reči, ali gre za eno ali dve enoti. Problem pri vrednotenju rezultatov funkcionalnega oživčenja lahko v našem modelu pomenijo tudi razlike v kvaliteti uporabljenih kultur mišičnih celic. Ker pa veljajo našti pomisleki tako za tretirane kot tudi za kontrolne eksplante, menimo, da njihov pomen za interpretacijo rezultatov ni bistven.

Ker je pod vplivom NT-3 delež kontrakcijsko pozitivnih eksplantov večji, nam tudi to govori, da NT-3 izboljša funkcionalne zmožnosti motonevronov. Primejava kontrolnih in tretiranih eksplantov nam v tem primeru pove, da NT-3 poveča zmožnost eksplanta, da vzpostavi vsaj eno kontrahirajočo enoto. V študijah Marša in sodelavcev, kjer rastnih dejavnikov niso dodajali, je delež kontrakcijsko pozitivnih eksplantov po desetem dnevu kokulture prišel padati (60), česar v naših poizkusih nismo zaznali, sicer pa je ta padec najbrž posledica eliminacije stikov ali izgube funkcionalnosti prej nastalih funkcionalnih ŽMS. Razen v zadnjem delu (od 11. dne dalje) časovni vzorec sprememb v deležu kontrakcijsko pozitivnih eksplantov (slika 6) dokaj dobro sledi časovnemu vzorcu, ki smo ga opazili pri štetju izrastkov iz eksplanta (slika 5). Ta ugotovitev govori v prid razmišljanju, da je zvečanje deleža kontrakcijsko pozitivnih eksplantov pod vplivom NT-3 v veliki meri posledica večjega izraščanja nevronov iz eksplanta, ki jo sproži ta nevrotrifin. To bi lahko posredno in dodatno podprlo tudi našo predpostavko, da NT-3 pospešuje izraščanje motonevronov v enaki meri kot izraščanje drugih nevronov, čeprav za to neposrednega dokaza nimamo.

Ugodni učinki NT-3 na delež kontrakcijsko pozitivnih eksplantov, ki se nakazujejo tudi v poznejših fazah, pa se ujema z rezultati Lohofove in sodelavcev, ki so že leta 1993 ugotovili, da akutna izpostavitve NT-3 poveča aktivnost in stabilnost razvijajočih se ŽMS (35). NT-3 bi zato mogoče lahko okreplil bolj aktivne sinapse po načelu pozitivne povratne zveze, ker ga pri večji sinaptični aktivnosti nastane v mišičnih celicah več. Znano je tudi, da NT-3

močnejše vpliva na učinkovitost in stabilnost ŽMS kot na preživetje celic (33).

Brodski s sodelavci je ugotovil, da 10 ng/ml NT-3 spodbuja holinergično diferenciacijo nevronov simpatičnih ganglijev piščančjih zarodkov na razvojni stopnji E12, kar so ugotavljali s povečano ravnijo izražanja holinergičnih označevalcev ChAT in VIP (45). V našem modelu so pokazatelji ŽMS skupki AChR (58). Braun in sodelavci so za NT-3 dokazali 2-kratno povečanje števila AChR, ki so jih označili z radioaktivnim  $\alpha$ -bungarotoksinom, vendar so v tej študiji opazovali število skupkov na milimeter oživčenega mišičnega vlakna po 4 tednih tretiranja (65). Povečano število skupkov na eksplant lahko razumemo kot pozitiven vpliv NT-3 na funkcionalne zmožnosti motonevronov, pri tem pa gre lahko za neposreden učinek na sinaptogenezo ŽMS ali posreden vpliv na rast izrastkov. Možno je namreč, da je število skupkov večje preprosto zaradi večjega števila izrastkov, ki so izrašali iz eksplanta. Zavedati se je treba tudi, da tvori motonevron sprva večje število ŽMS, od katerih se na koncu ohrani le eden (*za pregled glej 32*), zato bi lahko šlo opaženo povečanje števila skupkov oziroma ŽMS na račun tistih, ki bi kasneje propadli. Da bi lahko to izključili, bi morali število skupkov ocenjevati še v kasnejših fazah.

Pri preučevanju učinkov NT-3 se pojavi tudi vprašanje endogenega NT-3, ki se izraža v embrionalni in postnatalni skeletni mišici (71), sintetizirajo pa ga lahko tudi sami motonevroni in s tem vplivajo na preživetje nekaterih internevronov podganje embrionalne hrbtnjače (68). Endogeni NT-3 bi torej lahko bil v naših poskusnih razmerah dvojnega izvora; človeški iz mišičnih cevčic in podganji iz nevronov. Učinke endogenega NT-3 na funkcionalno oživčenje bi lahko v nadaljevanju poskusov ugotavljali tako, da bi kontrolne kulture primerjali s tistimi, ki bi jih tretirali z anti-NT-3-protitelesi. Gaesejeva in sodelavci so na ta način že raziskovali vlogo NT-3 pri razvoju spinalnih ganglijev (40), Loeb in sodelavci pa so ugotovili, da je sinteza NT-3 v mišičnih celicah odvisna od sinaptične aktivnosti (4).

### **Pomen raziskovanja vloge NT-3**

Raziskave na področju nevrotrofinov osvetljujejo pomembno plat delovanja živčevja, po

drugi strani pa tudi odpirajo pot do njihove morebitne terapevtske uporabe v prihodnosti, kar velja tudi za NT-3. Kljub mnenju, da je vpliv NT-3 na preživetje motonevronov manjši kot vpliv nekaterih drugih nevrotrofinov, so na pokusnih miših z degenerativnimi spremembami ŽMS dokazali, da je zelo učinkovit pri vzdrževanju delovanja in stabilnosti sinaps ter obnavljanju aksonov (33), kar bi lahko bilo velikega pomena za zdravljenje degenerativnih obolenj, kot je na primer amiotrofna lateralna skleroza. Preučujejo tudi vlogo NT-3 pri demielinizacijskih boleznih. NT-3 namreč pospešuje remielinizacijo po kemično povzročeni demielinizaciji (72), ima anti-apoptotske učinke na progenitorne celice oligodendrocitov (73), transfekcija prekursorjev oligodendrocitov z genom za NT-3 pa je imela pozitivne učinke na sintezo mielinškega bazičnega proteina (74). Na področju ishemičnih okvar osrednjega živčevja so pokazali, da nizkodozno zdravljenje z NT-3 deluje zaščitno na nevrone striatuma ob blagi neonatalni hipoksiji/ishemiji, kar se kaže kot povečano število preživelih nevronov striatuma (75). Pomen NT-3 raziskujejo tudi na področju obnavljanja osrednjega živčevja po poškodbi. Pri odraslih podganah so po predhodni enostranski prekinitvi piramidne proge pod vplivom NT-3 opazili rast intaktnih aksonov iz piramidnega trakta na drugi strani preko središčne linije proti poškodovanemu mestu (70). Opazili so tudi, da je izražanje NT-3 mRNA v koži bolnikov z diabetično nevropatijo značilno manjše (76), kar kaže na morebitno vpletanost NT-3 tudi pri razvoju kroničnih zapletov sladkorne bolezni. Raziskave NT-3 pa se ne omejujejo le na živčevje. Preučujejo namreč tudi njegov vpliv na imunski sistem, mastocite in alergijska obolenja, med njimi tudi astmo (77, 78).

Problem terapevtske rabe nevrotrofinov pa so med drugim tudi njihovi neželeni učinki in slabe farmakokinetične lastnosti. Sistemsko vnešeni nevrotrofini pri človeku imajo namreč kratek razpolovni čas in ne prehajajo krvno-možganske pregrade (79). Glede na možen vpliv NT-3 na številne patofiziološke procese, prinaša naša raziskava nov delček znanja o NT-3 in njegovih učinkih, kar bi lahko mogoče v prihodnosti vodilo v boljše razumevanje bolezenskih procesov in njegovo terapevtsko uporabo.

## ZAKLJUČKI

NT-3 pozitivno vpliva na preživetje motoneuronov in sposobnost izraščanja njihovih aksonov iz hrbtenjače, kar se kaže kot povečano število živčnih izrastkov na robu eksplantov podganje embrionalne hrbtenjače, ki so bili v naših poskusih v kokulturi s človeškimi mišičnimi cevčicami. Učinek je odvisen od koncentracije in je v naših razmerah najmočnejši pri 10 ng/ml NT-3.

NT-3 pri koncentraciji 10 ng/ml pozitivno vpliva tako na število kontrahirajočih enot na posamezen eksplant, kot tudi na na večji delež kontrakcijsko pozitivnih eksplantov in na večje število skupkov AChR v ŽMS, kar kaže na zvečano sposobnost motonevronskega, da tvori funkcionalni ŽMS.

Gornje ugotovitve potrjujejo našo hipotezo, da NT-3 izboljša zmožnosti motoneuronov za ustvarjanje funkcionalnih ŽMS. V naših razmerah je bil vpliv NT-3 bolj izrazit v začetnih fazah, ko nevroni izraščajo iz eksplanta.

V poznejših fazah, ko se primarni, nezreli stiki razvijajo v bolj diferencirane ŽMS, je bil učinek NT-3 manjši, čeravno še zmeraj opazen.

## ZAHVALA

Začetnik na področju raziskovalnega dela se na svoji poti srečuje s številnimi preprekami, ki na začetku izgledajo povsem nepremostljive. Zavedava se, da cilja ne bi mogla doseči brez pomoči drugih. Iskreno se zahvaljujeva mentorju prof. dr. Zoranu Grubiču in somentorju mag. Marku Jevšku za strokovno vodenje, potrpežljivost, trud in praktične napotke. Posebej se zahvaljujeva tudi Tomažu za pomoč v laboratoriju in pri izdelavi naloge.

Za prijetne ure v laboratoriju, moralno podporo in pomoč v zadnjem hipu se zahvaljujeva Zvonki, Oji in Katarini. Za vso tehnično pomoč pri izdelavi naloge, brez katere bi bila v mnogih trenutkih povsem izgubljena, se zahvaljujeva Rudiju Perdanu.

## LITERATURA

- Landreth GE. Growth factors. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Achers RW, Fisher SK, Uhler MD, eds. *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1999. p. 383-98.
- Lessmann V, Gottmann K, Malcangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol* 2003; 69 (5): 341-74.
- Lai KO, Fu WY, Ip FC, Ip NY. Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from carp. *Mol Cell Neurosci* 1998; 11 (1-2): 64-76.
- Loeb JA, Hmadcha A, Fischbach GD, Land SJ, Zakarian VL. Neuregulin expression at neuromuscular synapses is modulated by synaptic activity and neurotrophic factors. *J Neurosci* 2002; 22 (6): 2206-14.
- Wehrwein EA, Roskelley EM, Spitsbergen JM. GDNF is regulated in an activity dependent manner in rat skeletal muscle. *Muscle Nerve* 2002; 26 (2): 206-11.
- Gall C M, Pinkstaff JK, Lauterborn JC, Xie Y, Lynch G. Integrins regulate neuronal neurotrophin gene expression through effects on voltage-sensitive calcium channels. *Neuroscience* 2003; 118 (4): 925-40.
- Canossa M, Gartner A, Campana G, Inagaki N, Thoenen H. Regulated secretion of neurotrophins by metabotropic glutamate group I (mGluRI) and Trk receptor activation is mediated via phospholipase C signalling pathways. *EMBO J* 2001; 20 (7): 1640-50.
- Griesbeck O, Canossa M, Campana G, Gartner A, Hoener MC, Nawa H et al. Are there differences between the secretions characteristics of NGF and BDNF? Implications for the modulatory role of neurotrophins in activity-dependent neuronal plasticity. *Microsc Res Tech* 1999; 45 (4-5): 262-75.
- Canossa M, Griesbeck O, Berninger B, Campana G, Kolbeck R, Thoenen H. Neurotrophin release by neurotrophins: Implications for activity dependent neuronal plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94 (24): 13279-86.
- Snider WD. Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knock-outs are teaching us. *Cell* 1994; 77 (5): 627-38.
- Hempstead BL. The many faces of p75<sup>NTR</sup>. *Curr Opin Neurobiol* 2002; 12 (3): 260-7.
- Mischel PS, Smith SG, Vining ER, Valletta JS, Mobley WC, Reichardt LF. The extracellular domain of p75<sup>NTR</sup> is necessary to inhibit neurotrophin-3 signaling through TrkA. *J Biol Chem* 2001; 276 (14): 11294-301.
- Brennan C, Rivas-Plata K, Landis SC. The p75 neurotrophin receptor influences NT-3 responsiveness of sympathetic neurons in vivo. *Nat Neurosci* 1999; 2 (8): 699-705.
- Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 2000; 10 (3): 381-91.
- Heerssen HM, Segal RA. Location, location, location: a spatial view of neurotrophin signal transduction. *Trends Neurosci* 2002; 25 (3): 160-5.



16. von Bartheld CS, Butowt R. Expression of neurotrophin (NT-3) and anterograde axonal transport of endogenous NT-3 by retinal ganglion cells in chick embryos. *J Neurosci* 2000; 20 (2): 736–48.
17. von Bartheld CS, Wang X, Butowt R. Anterograde axonal transport, transcytosis, and recycling of neurotrophic factors: the concept of trophic currencies in neural networks. *Mol Neurobiol* 2001; 24 (1-3): 1–28.
18. Bamji SX, Majdan M, Pozniak CD, Belliveau DJ, Aloyz R, Kohn J et al. The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death. *J Cell Biol* 1998; 140 (4): 911–23.
19. Tuffereau C, Desmézières E, Bénéjean J, Jallet C, Flamand A, Tordo N, Perrin P. Interaction of lyssaviruses with the low-affinity nerve-growth factor receptor p75<sup>NTR</sup>. *J Gen Virol* 2001; 82 (Pt-2): 2861–67.
20. Lee FS, Kim AH, Khursigara G, Chao MV. The uniqueness of being a neurotrophin receptor. *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11 (3): 281–6.
21. Bibel M, Hoppe E, Barde YA. Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors Trk and p75<sup>NTR</sup>. *EMBO J* 1999; 18 (3): 616–22.
22. Casaccia-Bonnel P, Carter BD, Dobrowsky RT, Chao MV. Death of oligodendrocytes mediated by the interaction nerve growth factor with its receptor p75. *Nature* 1996; 383 (6602): 716–19.
23. Birling MC, Price J. Influence of growth factors on neuronal differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7 (6): 878–884.
24. Henderson CE. Role of neurotrophic factors in neuronal development. *Curr Opin Neurobiol* 1996; 6 (1): 64–70.
25. Buchman VL, Davies AM. Different neurotrophins are expressed and act in a developmental sequence to promote the survival of embryonic sensory neurons. *Development* 1993; 118 (3): 989–1001.
26. Barde YA. The nerve growth factor family. *Prog Growth Factor Res* 1990; 2 (4): 237–48.
27. Berninger B, Poo MM. Fast actions of neurotrophic factors. *Curr Opin Neurobiol* 1996; 6 (3): 324–30.
28. Ming GL, Lohof AM, Zheng JQ. Acute morphogenic and chemotropic effects of neurotrophins on cultured embryonic *Xenopus* spinal neurons. *J Neurosci* 1997; 17 (20): 7860–71.
29. Hari A, Djochar B, Skutella T, Montazeri S. Neurotrophins and extracellular matrix molecules modulate sensory axon outgrowth. *Int J Devl Neurosci* 2004; 22 (2): 113–17.
30. Cao X, Shoichet MS. Investigating synergistic effect of combined neurotrophic factor concentration gradients to guide axonal growth. *Neuroscience* 2003; 122 (2): 381–9.
31. Markus A, Patel TD, Snider WD. Neurotrophic factors and axonal growth. *Curr Opin Neurobiol* 2002; 12 (5): 523–31.
32. Personius KE, Balice-Gordon RJ. Activity-dependent editing of neuromuscular synaptic connections. *Brain Res Bull* 2000; 53 (5): 513–22.
33. Sendtner M. Neurotrophic factors: Effects in modulating properties of the neuromuscular endplate. *Cytokine Growth factor rev* 1998; 9 (1): 1–7.
34. Corse AM, Bilak MM, Bilak SR, Lehar M, Rothstein JD, Kuncl RW. Preclinical testing of neuroprotective neurotrophic factors in a model chronic motor neuron degeneration. *Neurobiol Dis* 1999; 6 (5): 335–46.
35. Lohof AM, Ip NY, Poo MM. Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF. *Nature* 1993; 363 (6427): 350–53.
36. Kang H, Schuman EM. Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science* 1995; 267 (5204): 1658–62.
37. Labelle C, Leclerc N. Exogenous BDNF, NT-3 and NT-4 differentially regulate neurite outgrowth in cultured hippocampal neurons. *Dev Brain Res* 2000; 123 (1): 1–11.
38. Tessarollo L, Coppola V, Fritzsche B. NT-3 replacement with brain-derived neurotrophic factor redirects vestibular nerve fiber to the cochlea. *J Neurosci* 2004; 24 (10): 2575–84.
39. Ernfor P, Lee KF, Kucera J, Jaenisch R. Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of proprioceptive afferents. *Cell* 1994; 77 (4): 503–12.
40. Gaese F, Kolbeck R, Barde YA. Sensory ganglia require neurotrophin-3 early in development. *Development* 1994; 120 (6): 1613–19.
41. Seebach BS, Arvanov V, Mendell LM. Effects of BDNF and NT-3 on development of Ia/motoneuron functional connectivity in neonatal rats. *J Neurophysiol* 1999; 81 (5): 2398–405.
42. Airaksinen MS, Koltzenburg M, Lewin GR, Masu Y, Helbig C, Wolf E et al. Specific subtypes of cutaneous mechanoreceptors require neurotrophin-3 following peripheral target innervation. *Neuron* 1996; 16 (2): 287–95.
43. Sieber-Blum M, Szeder V, Grim M. The role of NT-3 signaling in Merkel cell development. *Prog Brain Res* 2004; 146: 63–72.
44. DiCicco-Bloom E, Friedman WJ, Black IB. NT-3 stimulates sympathetic neuroblast proliferation by promoting precursor survival. *Neuron* 1993; 11 (6): 1101–111.
45. Brodski C, Schnurch H, Dechant G. Neurotrophin-3 promotes the cholinergic differentiation of sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97 (17): 9683–88.
46. Maisonpierre PC, Belluscio L, Friedman B, Alderson RF, Wiegand S, Furth ME et al. NT-3, BDNF and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron* 1990; 5 (4): 501–9.
47. Barres BA, Raff MC, Gaese F, Bartke I, Dechant G, Barde YA. A crucial role for neurotrophin-3 in oligodendrocyte development. *Nature* 1994; 367 (6461): 371–375.
48. Oorschot DE, McLennan IS. The trophic requirements of mature motoneurons. *Brain Res* 1998; 789 (2): 315–21.
49. Hughes RA, Sendtner M, Thoenen H. Members of several gene families influence survival of rat motoneurons in vitro and in vivo. *J Neurosci Res* 1993; 36 (6): 663–71.

50. Averbuch-Heller L, Pruginin M, Kahane N, Tsoulfas P, Parada L, Rosenthal A et al. Neurotrophin 3 stimulates the differentiation of motoneurons from avian neural tube progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91 (8): 3247–51.
51. Sanes JR, Jessell TM. The guidance of axons to their targets. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, eds. *Principles of neural science*. 4<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill; 2000. pp. 1063–86.
52. Ashby PR, Wilson SJ, Harris AJ. Formation of primary and secondary myotubes in aneural muscles in the mouse mutant peroneal muscular atrophy. *Dev Biol* 1993; 156 (2): 519–28.
53. Hauschka SD. The embryonic origin of muscle. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, eds. *Myology*. 2nd ed. New York: McGraw Hill; 1994. p. 3–73.
54. Sanes JR, Lichtmann JW. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci* 1999; 22: 389–442.
55. Burden SJ. Building the vertebrate neuromuscular synapse. *J Neurobiol* 2002; 53 (4): 501–11.
56. McMahan UJ. The agrin hypothesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1990; 55: 407–18.
57. Deyst KA, Jianyi M, Fallon JR. Agrin: Toward a molecular understanding of synapse regeneration. *Neurosurgery* 1995; 37: 71–7.
58. Askanas V, Kwan H, Alvarez R, Engel King W, Kobayashi T, Martinuzzi A, Hawkins E. De novo neuromuscular junction formation on human muscle fibres cultured in monolayer and innervated by foetal rat spinal cord: ultrastructural and ultrastructural-cytochemical studies. *J Neurocytol* 1987; 16 (4): 523–37.
59. Grubič Z, Komel R, Walker WF, Miranda AF. Myoblast fusion and innervation with rat motor nerve alter distribution of acetylcholinesterase and its mRNA in culture of human muscle. *Neuron* 1995; 14 (2): 317–27.
60. Marš T, YU K, Tang X, Miranda AF, Grubič Z, Cambi F, King MP. Differentiation of glial cells and motor neurons during the formation of neuromuscular junctions in cocultures of rat spinal cord explant and human muscle. *J Comp Neuro* 2001; 438: 239–51.
61. Mars T, King MP, Miranda AF, Walker WF, Mis K, Grubic Z. Functional innervation of cultured human skeletal muscle proceeds by two modes with regard to agrin effects. *Neuroscience* 2003; 118 (1): 87–97.
62. Miranda AF, Peterson ER, Musorovsky EB. Differential expression of creatine kinase and phosphoglycerate mutase during development in aneural and innervated human muscle culture. *Tissue Cell* 1988; 20 (2): 179–91.
63. Kobayashi T, Askanas V. Acetylcholine receptors and acetylcholinesterase accumulate at the nerve-muscle contacts of the de novo grown human monolayer muscle co-culture with fetal rat spinal cord. *Exp Neurol* 1985; 88 (2): 327–35.
64. Askanas V, Engel WK, Kobayashi T. Thyrotropin-releasing hormone enhances motor-neuron evoked contractions of cultured human muscle. *Ann Neurol* 1985; 18 (17): 716–19.
65. Braun S, Croizat B, Lagrange MC, Walter JM, Poindron P. Neurotrophins increase motoneurons' ability to innervate skeletal muscle fibers in rat spinal cord-human muscle cocultures. *J Neurolog Sci* 1996; 136 (1–2): 17–23.
66. Marš T. Nastajanje živčnomišičnega stika človeške mišice v razmerah in vitro [doktorsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2001.
67. Henderson CE, Camu W, Mettling C, Gouin A, Poulsen K, Karihaloo M et al. Neurotrophins promote motor neuron survival and are present in embryonic limb bud. *Nature* 1993; 363 (6426): 266–70.
68. Béchade C, Mallecourt C, Sedel F, Vyas S, Triller A. Motoneuron-derived neurotrophin-3 is a survival factor for PAX2-expressing spinal interneurons. *J Neurosci* 2002; 22 (20): 8779–84.
69. Dechant G, Rodriguez-Tébar A, Kolbeck R, Barde YA. Specific high-affinity receptors for neurotrophin-3 on sympathetic neurons. *J Neurosci* 1993; 13 (6): 2610–16.
70. Zhou L, Baumgartner BJ, Hill-Fellberg S, McGowen LR, Shine HD. Neurotrophin expressed in situ induces axonal plasticity in the adult injured spinal cord. *J Neurosci* 2003; 23 (4): 1424–31.
71. Griesbeck O, Parsadanian AS, Sendtner M, Thoenen H. Expression of neurotrophins in skeletal muscle: quantitative comparison and significance for motoneuron survival and maintenance of function. *J Neurosci Res* 1995; 42 (1): 21–33.
72. Jean I, Lavielle C, Barthelaix-Pouplard A, Fressinaud C. Neurotrophin-3 specifically increases mature oligodendrocyte population and enhances remyelination after chemical demyelination of adult rat CNS. *Brain Res* 2003; 972 (1–2): 110–18.
73. Saini HS, Gorse KM, Boxer LM, Sato-Bigbee C. Neurotrophin-3 and a CREB-mediated signaling pathway regulate Bcl-2 expression in oligodendrocyte progenitor cells. *J Neurochem* 2004; 89 (4): 951–61.
74. Rubio N, Rodriguez R, Arevalo MA. In vitro myelination by oligodendrocyte precursor cells transfected with neurotrophin-3 gene. *Glia* 2004; 47 (1): 78–87.
75. Galvin KA, Oorschot DE. Continuous low-dose treatment with brain-derived neurotrophic factor or neurotrophin-3 protects striatal medium spiny neurons from mild neonatal hypoxia/ischemia: a stereological study. *Neuroscience* 2003; 118 (4): 1023–32.
76. Anand P. Neurotrophic factors and their receptors in human sensory neuropathies. *Prog Brain Res* 2004; 146: 477–92.
77. Nassenstein C, Kerzel S, Braun A. Neurotrophins and neurotrophin receptors in allergic asthma. *Prog Brain Res* 2004; 146: 347–67.
78. Metz M, Botchkarev VA, Botchkareva NV, Welker P, Tobin DJ, Knop J et al. Neurotrophin-3 regulates mast cell functions in neonatal mouse skin. *Exp Dermatol* 2004; 13 (5): 273–81.
79. Miklič Š. Modulacija sinteze nevrotrofičnega dejavnika možganskega izvora (BDNF) v primarni kulturi astrocitov novorojenih podgan [doktorsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2004.