

# DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Patkány gerincvelői hátsó szarv felületes lamináiban található  
neuronok lokális kapcsolatszerének feltárása axon  
elágazódási mintázataik elemzésén keresztül**

Kókai Éva

Témavezető: Dr. Szücs Péter



DEBRECENI EGYETEM  
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2024

**Patkány gerincvelői hátsó szarv felületes lamináiban található  
neuronok lokális kapcsolatrendszerének feltárása axon  
elágazódási mintázataik elemzésén keresztül**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
Az elméleti orvostudomány tudományágban

Írta: Kókai Éva okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája  
(Élettani és Neurobiológiai programja) keretében

Témavezető: Dr. Szücs Péter, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Panyi György, MTA doktora  
tagok: Dr. Puskár Zita, PhD  
Dr. Horváth Balázs, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Biofizikai és  
Sejtbiológiai Intézet, 2.305 tárgyaló, 2024. szeptember 18. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Boczán Judit, PhD  
Dr. Sántha Péter, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Panyi György, MTA doktora  
tagok: Dr. Boczán Judit, PhD  
Dr. Sántha Péter, PhD  
Dr. Puskár Zita, PhD  
Dr. Horváth Balázs, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,  
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme, 2024. szeptember 18. 13 óra

## 1. Irodalmi áttekintés

### *A fájdalominformáció központi idegrendszeri feldolgozása*

Normál (és patológiás) körülmények között a fájdalmas és fájdalommentes stimulusok egy nagyon komplex rendszeren keresztül kerülnek feldolgozásra. A fájdalomhoz asszociált útvonal egy fájdalmas ingerrel kezdődik, ami lehet mechanikai, thermalis, kémiai, gyulladásos vagy szöveti károsodáshoz társuló. Ezek a káros ingerek általában az ún. nociceptorok szabad idegvégződésein keresztül továbbítódnak, amik különböző szövetekben, mint kötőszövetben, perifériás arteriolákban vagy a bőrben fordulnak elő. A nociceptorok (más néven primer afferens neuronok) pszeudo-unipoláris idegsejtek, amiknek perifériás axonjuk a sérülés helyén, a sejttestjük a hátsógyöki ganglionban találhatóak a hátsó gyökök mentén, míg a központi axonjuk a gerincvelő hátsó szarvába vetül

A gerincvelő hátsó szarvában a projekciós neuronok képezik a fő kimenetet az agyba. Ezek a neuronok az alapjai több felszálló pályának, beleértve a spinothalamicus és spinoreticulothalamicus pályákat, amik a fájdalominformációt szállítják a thalamusba és az agytörzsbe. A thalamusból további neuronok továbbítják a fájdalmas ingert az agykéregbe, ahol lehetővé teszik a fájdalomérzet észlelését.

A fájdalomérzékelés modulálása a fájdalom pályák különböző állomásain eltérő mechanizmusokkal történik, beleértve a hátsógyöki gangliont, a gerincvelő hátsó szarvát, az agytörzs retikularis rendszerét és az agykéregi területeket. Ezek a folyamatok szolgálnak arra, hogy a fájdalmas impulzust megváltoztassák, mielőtt eléri az agykéregt.

Ugyanilyen fontosságúak a fájdalomérzékelésben az agyi struktúrák irányából induló leszálló pályák a gerincvelőbe. Ezen pályák gerincvelőben kifejtett moduláló hatása a primer afferens bemenetek terminálisain, projekciós, serkentő és gátló interneuronokon, illetve egyéb leszálló pálya terminálisán bekövetkező interakción keresztül egyaránt megtörténhet.

## *A gerincvelő felépítése, a felszínes laminák jelentősége*

A gerincvelő (gv), azon belül a hátsó szarvi szürkeállomány laminái az a terület, ahol a külvilágból érkező fájdalmas ingerek elérik a központi idegrendszert, valamint ahol a szenzoros információ elsőként integrálódik. A hengeres megjelenésű gerincvelőt különböző szegmensekre oszthatjuk a következők szerint: cervicalis (C), thoracalis (T), lumbalis (L), sacralis (S) és coccygealis.

Keresztmetszeti képe makroszkóposan 2 területre osztható: a belső szürkeárnyalatú H betűt formázó, a canalis centralist közre fogó területe a szürkeállomány, ami idegsejtek sejttestjeit, nyúlványhálózatát és gliasejteket tartalmaz, a külső fehérállományt pedig a fel- és leszálló, valamint propriospinalis pályákat alkotó, myelinizált és nem-myelinizált axonok alkotják. A szürkeállomány teljes rostrocaudalis hosszában meglévő elülső és hátsó kitüremkedéseket mellső-, illetve hátsó szarvnak hívjuk, míg a thoracolumbalis szegmentumok magasságában ezekhez egy oldalirányú kitüremkedés az ún. oldalsó szarv is csatlakozik. A mellső szarv jellegzetes sejtjei a nagyméretű motoneuronok, a hátsó szarv pedig változatos méretű dominánsan multipolaris, a szenzoros információk kezdeti feldolgozásában és továbbításában részt vevő neuronokat tartalmazza. A szürke- és fehérállomány megoszlási aránya jellegzetesen változik a gerincvelő teljes szakaszán; a gerincvelő és a fehérállomány mérete legnagyobb az intumescencia cervicalis (C5-6) és lumbalis (L3-4) területén, mivel ide kapcsolódnak a felső- és alsó végtagok beidegzésében részt vevő plexusok.

A gerincvelő teljes szürkeállományát macskában Rexed 10, míg annak hátsó szarvát 6 párhuzamos rétegre, ún. laminákra osztotta az idegsejtek mérete és sűrűsége alapján. Ezt a sémát azóta már más fajokra is adaptálták, köztük emberre, majomra és patkányra. A hátsó szarv az a terület, amely elsősorban a szenzoros információk feldolgozásában vesz részt egy komplex neuronális hálózat segítségével, ami helyi és propriospinalis interneuronokból, valamint supraspinalis célpontokhoz vetítő projekciós neuronokból áll. Az információ ezekhez a neuronokhoz primer afferenseken keresztül érkezik a gerincvelőbe.

## *Primer afferensek*

A perifériáról érkező ingerek változó vezetési sebességgel váltanak ki érzetet a primer afferens rostok eltérő myelinizációjából adódóan. Ezek a rostok lehetnek myelinizáltak (A $\beta$ : 16-100 m/s, A $\delta$ : 5-30m/s), ami lehetővé teszi a gyors ingerületvezetést, vagy nem-myelinizáltak (C: 0,2-2 m/s). Elektrofiziológiai karakterük alapján is csoportosíthatjuk őket, mint alacsony küszöbű primer afferens, ami nem károsító, alacsony intenzitású ingereket továbbít és nem fájdalmas érzetet vált ki, továbbá mint magas küszöbű, aminek funkciója a nagy intenzitású, potenciálisan károsító ingerek továbbítása. Ez a klasszifikáció azonban nem képes precízen szétválasztani azokat a komplex funkciókat ellátó neuronokat, amik diverz stimulációt kódolnak, mint például a környezet hőmérsékletét, felületek textúráját, egy szellő irányát, stb.

Az A rostok főként alacsony küszöbű mechanoreceptorokként (A-LTMR) vannak jelen, ezen felül azonban az A $\delta$ -rostok feltételezhetően felelősek az akut, kis látenciájú szűrő fájdalom érzékeléséért és az A $\beta$  némelyike is képes fájdalmas ingerre válaszolni.

A C rostok szenzoros modalitásuk alapján feloszthatóak tapintási ingereket feldolgozó alacsony küszöbű rostokra (C-LTMR), valamint magas küszöbű rostokra, amik mechanikai és fájdalmas hő ingerre válaszolnak. Ezeket a nocicepcióban részt vevő C rostokat feloszthatjuk továbbá neurokémiai modalitásuk alapján peptiderg és nem peptiderg csoportokra. A peptiderg C rostok (és a nocicepcióban részt vevő A $\delta$  rostok) neuropeptideket expresszálnak és calcitonin génhez kapcsolódó peptidet, P anyagot és galanint tartalmaznak. Ezek az afferensek kifejeznek tranziens receptor potenciál vanilloid 1-et (TRPV1), szerepük a hő okozta fájdalom érzékelésében van. A C nociceptorok másik, nem peptiderg csoportja a mechanikai fájdalom normális érzékelésében vesz részt. Jellemzően Mrgpdr-t (Mas-proteinhez kapcsolt D receptortag) fejeznek ki, TRPV1-et azonban nem expresszálnak és neuropeptidekkel sem rendelkeznek. Még 2 másik típusát írták le a C típusú rostoknak: a szomatosztatin és B-típusú natriuretikus polipeptidet ko-expresszálót, valamint a MrgA3/MrgC11 (Mas-proteinhez kapcsolt receptorcsalád 2 tagja) expresszálót. Mindkét típus a pruricepcióban vesznek részt.

A különböző szenzoros modalitások feldolgozásához a primer afferensek központi terminálisai szigorú sorrendbe rendeződnek. A vékonyan myelinizált A $\delta$  és a nem-myelinizált C afferensek elsődlegesen a felszínes laminákban (I-II-es lamina) végződnek, ami a fő nociceptív feldolgozó területe a gerincvelőnek. A mélyebben elhelyezkedő III-as laminában végződnek a szőrszalakat beidegző A $\delta$  afferensek és az alacsony küszöbű mechanoreceptoroként funkcionáló A $\beta$  afferensek is.

Egyre több bizonyítékot találnak azonban arra, hogy ez a szegregáció nem jelenti a feldolgozó neuronhálózatok teljes elkülönülését. Az utóbbi években publikálásra kerültek olyan eredmények, ahol azt találták, hogy hátsó szarvi neuronok alacsony küszöbű mechanoreceptorokat kötnek össze nociceptív információt feldolgozó neuronokkal közvetlenül vagy további, különböző típusú serkentő és gátló interneuronokon keresztül.

### ***A felszínes laminák neuronjainak morfológiai és elektrofiziológiai karakterizálása***

#### **I-es lamina**

Az I-es lamina egy finom peremet képez a gerincvelői szürkeállomány hátsó szarvának dorsalis széle mentén. A hátsó szarv lateralis oldalánál enyhén elhajlik, a medialis oldal viszont határozottabban végződik a hátsó szarv dorsalis részének medialis végén, ahol gyakran látható myelinizált rostok belépése. A vékony lamina nem válik el élesen a fehérállománytól. Korai leírásokban még a substantia gelatinosa felszínes rétegének tekintették, de ma már elfogadott, hogy az I-es lamina egy különálló strukturális és funkcionális egység, amin belül megkülönböztetünk projekciós, valamint interneuronokat.

A projekciós neuronok főként az I-es és V-ös laminában helyezkednek el, de elszórtan megjelenhetnek a III-VI-os laminában is. A hátsó szarvi projekciós neuronok nagy többségének főaxonja kereszteződik a gerincvelő középvonalán és az ellenoldali fehérállományban jut el supraspinalis célpontjaihoz. Az I-es laminában ugyanakkor, hasonlóan a többi hátsó szarvi laminához, döntően interneuronok helyezkednek el. Ezekre a sejtekre az a jellemző, hogy axonjuk helyben marad, nem hagyja el a felszínes laminákat (I-III), fenotípus alapján lehetnek serkentőek vagy gátlóak.

Megjelenésük alapján, az általánosan elfogadott osztályozási séma szerint 3 vagy 4 altípust különböztetünk meg: fusiformis, multipolaris, piramis alakú vagy fusiformis, multipolaris, piramis alakú, valamint ellaposodott. Ezek az osztályozások azonban csak a szomatodendritikus sajátosságokat veszi figyelembe. Ennek legfőbb oka, hogy a legtöbb klasszikus jelölési technika (a korábban használt Golgi-módszer vagy a későbbi dextranokat használó retrograd jelölési technikák) nem alkalmasak az axonok részletes megjelölésére.

A fent ismertetett morfológiai jegyek és az elektrofiziológiai mérések során meghatározott akciós potenciál (AP) mintázatok között ugyanakkor sikerült bizonyos korrelációt igazolni. Az I-es lamina neuronjai depolarizációt kiváltó áraminjekciók hatására tónusosan (alacsonyabb frekvenciával, egyenletesen), fázisosan vagy adaptálódóan (a tüzelés során a frekvencia és az amplitúdó is csökken), késleltetett módon (az első AP az áraminjekció kezdetéhez képest késve jelenik meg), illetve egyetlen AP-val válaszolva (“single spike”) tüzelnek. A fusiformis neuronok tipikusan tónusos tüzelési mintázatot mutatnak, a piramis alakú sejtek fázisosat, a multipolaris sejtek pedig lehetnek késleltetettek vagy “single spike”-ot mutatóak is. Egyes tüzelési mintázatok továbbá úgy tűnik, hogy bizonyos funkciókhoz köthetők a hátsó szarvban. A tónusos és késleltetett tüzelési mintázatokkal rendelkező sejtek főként integrátorként vesznek részt a folyamatokban, míg a fázisos és “single spike” tüzelésű sejtek pedig inkább közvetítő szerepet töltenek be.

## **II-es lamina**

A II-es lamina (substantia gelatinosa) az I-es lamina alatt, ventralisan helyezkedik el. Toluidinkék háttérfestést követően 2 részre osztható: egy intenzívebben jelölődő külső részre (LIIo- *lamina II outer*), ahol a sejtek tömöttebben helyezkednek el, valamint egy belső részre (LIIi- *lamina II inner*), ahol kissé lazábban találhatóak a sejtek. Ez a lamina jellegzetesen kisméretű sejteket tartalmaz és viszonylag mentes a myelinizált rostoktól. A II-es lamina medialis részét dorsalis irányból belépő, vastag myelinhüvelyes, nagy vezetési sebességű axonok szelik át. Emiatt, különösen a lumbalis szegmentumokban a II-es lamina medialis oldala vastagabbnak tűnik.

Perl kollaborációs partnereivel számos faj (többek között patkány) gerincvelői metszetében végzett intracellularis méréseket és sejtjelölést, amely kísérletek megalapozták a máig is használt klasszifikációs csoportokat. A II-es laminában 5 főbb sejtípust határoztak meg: islet, centralis, radialis, medialis-lateralis és verticalis. Az itt található neuronok dendritfája jellegzetesen rostrocaudalis kiterjedésű, mediolateralisan és dorsoventralisan - a verticalis neuronok kivételével - inkább lapított. Tüzelési mintázatuk tekintetében hasonlóak az I-es lamina neuronjaihoz (tónusos, fázisos, késleltetett, „single spike”), de ebben a laminában előfordulnak további tüzelési mintázatok is. Az ún. „gap” tüzelési mintázat esetén valamely két AP (jellemzően a sorozat elején) között a késés 1,5-szerese a két megelőző vagy azt követő 2 AP közötti késésnek. Egy másik kategória a „reluctant” (magyar megfelelője talán a „vonakodó” lehetne) tüzelési mintázat, amely típusnál a sejtek igen kifejezett depolarizáció hatására sem produkálnak AP-t. Yasaka munkacsoportjával azt találta, hogy a legtöbb (bár nem az összes) II-es lamina serkentő sejt késleltetett, „gap” vagy „reluctant” tüzelési mintázatot mutat.

### **III-IV-es lamina**

A III-as laminában sűrűn, csoportosulva helyezkednek el a kis méretű sejtek, emiatt a II-es és III-as lamina határa nem egyértelműen felismerhető. Ebben a laminában ugyanakkor már láthatóak myelinizált rostok, ami segíti az elkülönítést. A III-as lamina lateralis széle követi az I-II-es lamina görbületét, de emellett medialisan is mutathat kismértékű elhajlást. Dorsoventralisan területe a középvonalnál nagyobb, mint a két szélső oldalán. Ehhez képest a IV-es lamina szétszórtan tartalmaz közepes és nagyobb, morfológiailag heterogén sejteket. Medialis határa követi a hátsó szarv alakját, viszont a korábban az I-III-as laminában ismertetett lateralis elgörbülés nem jellemző erre a területre.

Ezek a laminák már a hátsó szarv kevésbé vizsgált területeihez tartoznak. Az egyik jobban tanulmányozott sejtípus a nagy méretű antenna sejt (ANT), amely piramis alakú sejttestje a III-IV-es laminában foglal helyet. Egyes NK-1 receptort (NK1R) expresszáló antenna sejtek az agytörzs és a thalamus nociceptív területein végződnek, vannak azonban olyan antenna sejtek is, amik supraspinalisan nem projiciálnak és intrinsic vagy propriospinalis neuronokként működnek. Mindkét típusú antenna sejt

rendelkezik egy dorsalis dendrittel, ami keresztülnyúlik a II-es laminán, majd intenzíven elágazik az I-es laminában, míg a ventralis dendritjeik a mélyebb laminák irányába terjeszkednek. Ez a morfológiai adottság lehetővé teszi, hogy többféle, különböző szenzoros modalitásokhoz tartozó primer afferens bemenetet integráljon. Immunhisztokémiai vizsgálatok igazolták, hogy a dorsalis dendritek nagyszámú peptiderg és nem-peptiderg vékony primer afferens kapcsolatot fogadnak, vastag myelinizált primer afferensekkel azonban sokkal ritkábban kapcsolódnak. Kimutatták továbbá, hogy emellett helyi interneuronok axonjai is adnak rájuk szinapszisokat, ami arra utalhat, hogy ingerlékenységüket a gerincvelői hálózat szabályozhatja. Bár ezen sejtek elektrofiziológiai sajátosságairól jelenleg még kevés információ áll rendelkezésre, úgy tűnik azonban, hogy széles dinamika-tartományú (*WDR-wide dynamic range*) vagy gyenge mechanikai stimulációra, esetleg egy közvetlen elektromos stimulációra reagáló neuroncsoport lehet.

## **V-VI-os lamina**

A hátsó szarv nyaki részétől található az V-ös lamina. Sejtjei heterogének és megjelenésükben nagyobbak a IV-es laminában találhatóaknál, dendritjeikkel dorsalisán elérhetnek a II-III-as laminába, míg ventralisan a VII-es laminába is. A VI-os lamina a hátsó szarv legventralisabb területe, azonban nem minden szegmensben található meg (T6-L2, S2-4). Sejtjei kisebbek és jobban rendezettebbek, mint az V-ös laminában található sejtek. Az itt található interneuronok a reflex útvonalak kialakításában vesznek részt.

### ***A hátsó szarvi idegsejtek neurokémiai karakterizálásának rövid áttekintése***

Fő neurotranszmittereik alapján a hátsó szarvi neuronokat 2 csoportba tudjuk osztani: serkentő sejtekre, amik glutamatergek és vezikuláris glutamate transzporter 2-t (VGLUT2) expresszálnak, valamint gátló idegsejtekre, amik  $\gamma$ -aminovajsavat (GABA -  $\gamma$ -aminobutyric acid) és/vagy glycint szabadítanak fel. Larsson becslése alapján patkányban a neuronok 36-53%-a gerincvelő I-III-as laminájában gátló sejt.

Az I-II-es lamina serkentő sejtjei esetén 6 jól elkülönülő neuronpopulációt tudott Gutierrez-Mecinas kollégáival meghatározni neurokémiai markereik alapján egér gerincvelőben. A serkentő sejtek az I-

II-es laminában eredményeik alapján neurotensint (9%), P anyagot (más néven tachykinin 1; 24%), neurokinin B-t (14%), gasztrin-felszabadító peptidet (15%), cholecystokinin-t (7%), vagy neuropeptide FF-t (6%) expresszálnak. A serkentő sejtek további (hozzátévelegesen) 25%-a ezekbe a csoportokba nem sorolható.

Ugyanez a munkacsoport a továbbiakban a gátló sejtek esetén is feltárt 5 csoportot. Egy minimális átfedést fedeztek fel a galanin- dynorphin (24%) és neuronális nitrogén-monoxid szintáz (nNOS, 17%) pozitív sejtek esetében, valamint a galanin-dynorphint és neuropeptid Y-t (33%) expresszáló sejtek között. Az I-II-es laminában továbbá elkülönítettek parvalbumint (11%) és calretinint (27%) tartalmazó gátló sejteket is. Megjegyzendő, hogy a dynorphin, nNOS, parvalbumin vagy calretinin pozitív sejtek lehetnek serkentő sejtek is, ezek megkülönböztetésére használható a Pax2 transzkripciós faktor, mint megbízható gátló sejt marker.

### ***NK1 receptorral rendelkező sejtek eloszlása a hátsó szarvban***

Minden P anyag tartalmú primer afferens részt vesz a nocicepcióban, fő célpontjuk pedig az NK1 receptor, ami behatárolt disztribúciót mutat a hátsó szarvban. Az I-es lamina sejtjeinek ~45%-a expresszál NK1R-t, a II-es laminában nagyrészt hiányzik, majd kisebb százalékban újra megjelenik a mélyebb laminákban.

Az I-es lamina projekciós sejtjei patkányban 80%, míg egérben a sejtek 90% mutat NK1R pozitivitást. Bár a receptor serkentő interneuronokban is megtalálható, expressziós szintje alacsonyabb a projekciós neuronokénál. A III-as lamina antenna sejtjei is tartalmazhatnak NK1R-t és ezek a sejtek is megfeleltethetők projekciós neuronokként.

### ***Ismert axonelágazódási mintázatok a gerincevelő lumbalis szakaszának felszínes lamináiban***

Ramón y Cajal a Golgi-módszer használatával számos gerincevelő neurontípust írt le, melyeket a későbbiekben főként a neuronok szomatodendritikus sajátosságaira, valamint a gerincevelő hátsó szarvában való elhelyezkedésükre alapozva kategorizáltak. Ezek a klasszifikációk azonban ritkán vették figyelembe az axon sajátosságait, kiterjedését és lamináris

elhelyezkedését. A transzgen egerek használatával és az új anatómiai, képalkotó, egy-sejt elektrofiziológiai módszerek használatával, valamint transzkripcióanalízis segítségével számos serkentő és gátló neuront sikerült azonosítani a különböző laminákon belül. A gerincvelői hálózatok jobb megértését célozták a különböző technikákat kombináló kísérletsorozatok is, amik feltártak bizonyos anatómiai sajátosságokat, valamint azonosították egyes sejttípusok posztszinaptikus célpontjait, azonban ezekben az esetekben sem tekintették célként az individuális sejtekhez tartozó axonhálózat megismerését.

A korai axon kiterjedéssel foglalkozó tanulmányok elsősorban *in vivo* tormaperoxidáz jelölések eredményei alapján tettek megfigyeléseket majomban és macskában. Később Yasaka munkacsoportjával morfológiai és elektrofiziológiai paramétereket együttesen vizsgálta II-es lamina serkentő és gátló sejtjei esetén patkányban, míg a III-as lamina cholinerg sejtjeinek axonhálózatát Mesnage és munkatársai, a projekciós neuronokat pedig Browne és munkatársai vizsgálták. Bár ezek a vizsgálatok hiánypótlónak tekinthetők a neuronhálózatok megértésében, azonban a vizsgálatok gerincvelői szeletpreparátumokban történtek, amik nem teszik lehetővé a nagy kiterjedésű nyúlványok, mint amilyen az axon, kiterjedésének és disztribúciójának részletes és alapos vizsgálatát.

A szeletpreparátum jelentette limitációkat küszöböli ki az a technika, melyet témavezetőm és portugál munkatársai fejlesztettek ki, ami során az IR-LED segítségével lehetővé válik fiatal rágcsálók intakt gerincvelő preparátumainak felszíni vizsgálata. A munkacsoport a technika segítségével teljes sejtrekonstrukciókat tudott készíteni az individuálisan jelölt neuronokról és ezáltal részletes leírást adott az I-es laminában található projekciós, illetve interneuronok axonélágazódási mintázatairól.

2010-es közleményükben az anterolaterális projekciós neuronok újfajta, az ipsilaterális axonkollaterálisok elágazódási mintázata alapján történő csoportosítási lehetőségét javasolták. Az új klasszifikáció alapján dorsalis, laterális, ventralis, valamint kevert típusú kollaterálissal rendelkező projekciós neuronokat különböztettek meg. Kimutatták továbbá, hogy a korábban már leírt morfológiai fenotípus, azaz az I-es laminában található sejtek főaxonjának dendritikus kiindulása, az anterolaterális projekciós neuronok esetében kifejezetten gyakori, mivel a sejtek kétharmadánál

megfigyelhető volt.

Az I-es lamina interneuronok axonelágazódási mintázatának vizsgálata során megállapították továbbá, hogy azok rostrocaudalisan több szegmentumra kiterjedő, nagyszámú axonvarikozitással (lehetséges szinaptikus terminálissal) rendelkező komplex axonokkal rendelkeznek. Az axonok, akár csak a projekciós neuronok lateralisán elhelyezkedő axonkollaterálisai gyakran léptek ki a funiculus dorsolateralisba, vagy a Lissauer kötegbe, majd onnan ismét vissza a hátsó szarvi szürkeállományba, ami propriospinalis kapcsolatok kialakítására is utalhat.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Ahogy az a bevezetésben bemutatásra került a gerincvelő felszínes lamináiban található különböző sejtpopulációk axonjainak elágazódási mintázata még mindig szinte alig ismert, azonban alapvető fontosságú lenne a neuronok kapcsolatrendszerének megismerésében és megértésében. Portói kollaborációs partnereinkkel korábban leírtunk egy alacsony küszöbű rostok által közvetített gátlást (Luz és mtsai. 2014), ami a projekciós neuronokra egy közbeiktatott gátló sejten keresztül érkezik. A vastag rostok elhelyezkedése alapján valószínűsítettük, hogy ez a közbeiktatott gátló sejt valószínűleg a mélyebb laminákban helyezkedik el. Ennek bizonyításához kollaborációs partnereink III-as lamina sejteken végeztek elektrofiziológiai méréseket, amik közül elsőként az antenna-típusú neuronok struktúra-funkció vizsgálatát végeztük el (Fernandes és mtsai. 2018). Ezután egy, az I-es lamina sejtjeit (projekciós és interneuronokat) megcélzó elemzéssorozatot terveztünk, ahol célunk az axon- és dendrithálózat morfológiai paramétereinek kiterjesztettebb összehasonlító elemzése volt, mind a gerincvelői interlamináris lefedettségük, mind szimmetriájuk tekintetében.

*Célkitűzésünk tehát a következők voltak:*

- 1) a rendelkezésünkre álló, előzetesen biocytinnel töltött neuronok teljes 3D rekonstrukcióját követően a lehető legpontosabb kvantitatív és kvalitatív morfológiai elemzés elvégzése, hogy teljesebb képet kapjunk a vizsgált neuronok potenciális kapcsolatrendszeréről
- 2) a korábbi elektrofiziológiai kísérletekből származó megfigyelések és irodalmi adatok összevetése az egyes neuroncsoportok morfológiai vizsgálatával feltárt feltételezett szerepeivel.

### 3. ANYAG ÉS MÓDSZER

Munkám során olyan fiatal (9-20 napos) Wistar patkányok gerincvelőjéből készült preparátumok neuronjait elemeztem, amelyek elektrofiziológiai mérés során lettek megjelölve portugál kollaborációs partnerünk jóvoltából (*Instituto de Biologia Molecular e Celular, Porto, Portugália*). A kísérletek portói partnerünknel, az ottani laboratórium helyi etikai engedélyével összhangban és annak mindenben megfelelően történt. Az intakt gerincvelő preparátumban megjelölt neuronok szövettani feldolgozását követően a metszetekből a PhD munkámat képező sejtrekonstrukciókat és az azt követő morfológiai elemzést a Debreceni Egyetemen végeztem.

#### ***Gerincvelői blokkokban- és szeletpreparátumokon végzett in vitro elektrofiziológiai kísérletek rövid áttekintése***

Kutatási munkám patch-clamp technikával, különböző preparátumokban elvezetett és egyidejűleg megjelölt idegsejtek morfológiai elemzése volt. Megjegyzendő, hogy az elemzésekhez felhasznált sejtek elektrofiziológiai elvezetése és elemzése során nem voltam jelen, ennek megfelelően a releváns elektrofiziológiai vizsgálatok metodikáját is csak röviden ismertetem, eredményeikről csak a diszkusszióban, a struktúra-funkció megvitatása során tesztek említést.

A gerincvelői blokkpreparátum elkészítéséhez 9-20 napos Wistar patkányokat  $\text{Na}^+$ -pentobarbital intraperitonealis injekciójával altatták, majd a talp visszahúzási reflex eltűnése után az állatot dekapitálták. A gerincvelőt gyorsan eltávolították és oxigenizált arteficiális agy-gerincvelői folyadékba (ACSF- *arteficial cerebrospinal fluid*) helyezték. Az I-es lamina sejtek elvezetése során a lumbalis szakaszt (L1-L6) 3 különálló darabra osztották (L1-L2, L3-L4 és L5-L6), míg a III-as lamina sejteknél az L4-5-ös szegmentumokat tartották meg. A gerincvelői blokkok dorsalis felszínéről a pia matert eltávolították mindkét esetben, ilyen módon hozzáférést biztosítva a mérőelektrodának a neuronokhoz. A primer afferens bemenetek meghatározásakor (kizárólag a III-as lamina sejtek esetében) az L4 és/vagy L5 hátsó gyökere megtartásra került elektromos stimuláció céljából, az elektrofiziológiai elvezetések pedig kizárólag az L4 szegmentumból történtek.

Az elektrofiziológiai méréseket a blokkpreparátum esetén a gerincvelő szürkeállományának legfelszínesebb rétegében (LI), valamint körülbelül 100  $\mu\text{m}$  mélységben (LIII) ferde IR-LED megvilágítási technikával végezték. A sejttest lamináris elhelyezkedése a mérések végeztével a szövettani feldolgozás során, toluidinkék háttérfestés segítségével került minden esetben meghatározásra.

Az elektrofiziológiai mérések teljes-sejt konfigurációban történtek, melyek esetén vastag falú boroszilikát kapillárisból készült pipettákat használtak (ellenállás: 4-5  $\text{M}\Omega$ ; BioMedical Instruments, Németország). A pipettában található belső oldatot 0,5-1% biocytinnel (Sigma, St. Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok) egészítették ki a neuronok későbbi morfológiai azonosítása céljából. Bizonyos esetekben ( $n=12$ ) a mért neuronok axonjainak neurotranszmitter tartalmát immunhisztokémiai reakcióval is ellenőrizték. Mivel ez a reakció csak a dolgozatban felhasznált sejtek 1/3-ára terjedt ki, így ezeket az eredményeket a sejtek összehasonlításánál nem vettük figyelembe. Megemlítenéd ugyanakkor, hogy ezekben az esetekben 0,5% biocytin és 0,5% rhodamine-red keverékével egészült ki a pipettában lévő belső oldat, ami bár a biocytin jelölés erősségét kis mértékben csökkentette, a részletgazdag 3D rekonstrukciót szignifikánsan nem akadályozta.

A mérések során rögzített különböző aktív és passzív membránparaméterek közül kizárólag az emelkedő amplitúdójú depolarizáló áramimpulzusokkal kiváltott ún. tüzelési mintázatot vetettük össze a kapott morfológiai paraméterekkel, mivel ez a paraméter képezi korábban már leírt klasszifikációk alapját is. A hátsó szarvi neuronok tüzelési mintázatainak meghatározásakor portói kollaborációs partnereink és mások által korábban leírt kategóriákat (tónusos, adaptálódó, késleltetett és ritmikus) használtuk fel.

### ***Szövettani feldolgozás***

Az elektrofiziológiai mérést követően a gerincvelői preparátum 4% paraformaldehidbe került immerziós fixálás céljából. A szövettani feldolgozás során a gerincvelőket előbb több alkalommal 0,1M foszfát pufferrel (PB) mosták át, majd 2,5% agarózba öntve vibratóm (Leica VT1000) segítségével 100  $\mu\text{m}$ -es sorozatmetszeteket készítettek belőlük.

Munkacsoportunk korábbi morfológiai leírást célzó munkái során döntően sagittalis metszeteket használt, mivel így a kevesebb számú sorozatmetszet a rekonstrukció során könnyebben illeszthető, és az átfedő nyúlványokkal bíró sejtek szétválasztása is egyszerűbb. Ugyanakkor a sagittalis metszetekből történő rekonstrukció, különösen a gerincvelő görbülő lateralis szélén, nem teszi lehetővé a pontos mediolateralis és lamináris elhelyezkedés meghatározását. Mivel PhD munkám pontosan ezeknek a hiányzó adatoknak a meghatározását célozta meg, a rekonstrukciókhoz olyan sejteket választottunk, amelyekből a szövettani feldolgozás során a transversalis síkban készítették metszeteket. A sorozatmetszetek készítésekor itt is kitüntetett figyelmet kapott a metszetek orientációjának megtartása a későbbi rekonstrukció megkönnyítésének céljából. Ennek érdekében a szeletelés folyamata előtt a gerincvelőt tartalmazó agaróz blokk egyik sarkát levágták, a szeleteket pedig 24-lyukú tenyészítő plate egymást követő lyukaiba egyenként gyűjtötték.

A metszést követően az elektrofiziológiai mérés során a sejtbe jutott biocytint a hozzá erősen kötődő tormaperoxidáz (HRP- *horseradish peroxidase*) konjugált avidin 3,3'-diaminobenzidin (DAB) csapadékkal történő kimutatásával tették láthatóvá (Gomba 2005). A folyamat első lépésként a metszetekben blokkolták az endogén peroxidáz aktivitást 0,6% hidrogén-peroxiddal ( $H_2O_2$ ; 40 percig, szobahőn), mivel a lépés kihagyása a vörösvértetek intenzív barna jelölését eredményezné, amik pedig elfedhetik a vékony sejtnyúlványokat a rekonstrukciók során. Ezután 50%-os alkohollal permeabilizálták a metszeteket (1 óra, szobahőn). A lépések között minden alkalommal többször váltott mosást alkalmaztak, ügyelve arra, hogy a metszetek ne tapadjanak ki a plate lyukainak falához vagy aljához.

Az alkoholos feltárást követően a foszfát mosópuffer (0,1 M) helyett a továbbiakban sós- Tris- foszfát puffert (TBS-t) használtak, amit 0,1% triton x-100-zal egészítettek ki a penetráció javításának érdekében. Ezt követően a peroxidáz konjugált avidint (ExtrAvidin-Peroxidase; Sigma, St. Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok, 1:1000) 2 óráig alkalmazták a metszeten szobahőn, majd 4°C-on egész éjszaka. Az alapos mosás után végezték el a DAB kromogén reakciót, aminek hatására egy barna színű, oldhatatlan csapadék keletkezett a biocytint tartalmazó sejtnyúlványokban. A reakció előrehaladását preparáló mikroszkóp alatt követték nyomon, hogy a zavaró háttérjelölés megjelenése előtt leállítható legyen a reakció TB-vel (Tris-

foszfát puffer) történő mosással.

A DAB-bal történt vizualizálást követően a metszeteket tisztított króm-kálium-szulfát zselatinnal fedett tárgylemezre húzták fel, ügyelve a metszetek sorrendjére és orientációjára. A száradás után a metszeteket rehidrálták, majd a laminák határainak meghatározásának érdekében, valamint, hogy a jelölt struktúrák könnyebben észrevehetőek és követhetőek legyenek, toluidinkék (0,1%) háttérfestést alkalmaztak. Víztelenítés, majd xylozol derítést követően a metszeteket végezetül DPX-szel (Sigma, St. Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok) fedték le.

### ***A sejtrekonstrukciók menete***

A neuronok 3 dimenziós rekonstrukcióit NeuroLucida szoftver (9-es és 10-es verzió; MBF Bioscience, Williston, Amerikai Egyesült Államok) segítségével végeztük el a sorozatmetszeteket tartalmazó tárgylemezekről. A III-as lamina sejtei esetén szomatodendritikus morfológiai paramétereik alapján antenna-típusú sejteket vizsgáltunk (n=9), az I-es laminából pedig 10 db projekciós sejtet és 15 db interneuront választottunk ki elemzésünk tárgyául.

A rekonstrukció során a gerincvelői sejtek nyúlványainak azonosítását karakterisztikus morfológiai jegyeik segítették: a dendritek fokozatosan vékonyodó, felszínük esetekben töviseket („spine”) tartalmazhat, míg az axonok közel folytonos vastagságúak és a vékony variánsaikon gyakori különböző nagyságú varikozitások is megtalálhatóak.

A vizsgált idegsejtek esetében a nyúlványok az esetek jelentős részében (n=25) elérték a preparátum rostralis és/vagy caudalis végét (ennek meghatározása az első és utolsó metszetek fehér- és szürkeállományának aránya, illetve utóbbi alakja alapján történt). Emiatt a sejtek rostrocaudalis kiterjedésének feltüntetésére nem térek ki.

### ***Kvantitatív morfológiai elemzések***

A rekonstruált sejtek nyúlványdarabjainak eloszlását NeuroLucida Explorer szoftverrel vizsgáltam (9-es és 10-es verzió; MBF Bioscience, Williston, Amerikai Egyesült Államok). A lamináris eloszlások és a sejtek

helyzetének meghatározásához elengedhetetlen, hogy a metszeteken a vizsgálni kívánt területeket zárt kontúrokkal legyenek körbevéve, ugyanis a program ezeken belül tudja a nyúlványok, markerek mennyiségét meghatározni. Megjegyzendő, hogy a vizsgált projekciós neuronok esetében a főaxont kihagytuk az elemzésből, mivel ennek lefutása jól karakterizált és nem játszik szerepet lokális kapcsolatok kialakításában.

### *Interlam ináris megoszlás elemzése*

A laminahatárok meghatározásakor a munkacsoportunk korábbi közleményeiben használt, neonatalis patkányokkal végzett kísérletekből adaptált lamina-határokat vettük alapul, hiszen fiatal patkányokra standardizált atlasz nem áll rendelkezésre. A laminahatárok megrajzolásához a toluidinkék háttérfestéssel kezelt lumbalis gerincvelő metszetek sejtsűrűség és méret eloszlásai alapján a szürkeállományon belüli jellegzetes területeket vettük figyelembe. Ezek alapján 7 régiót definiáltunk: a II-es laminában jellegzetesen sok, kis méretű neuron található, ettől dorsalisán található, többnyire nagyobb sejtekből álló, egy sejsornyi réteg adta meg az I-es lamina régióját. A III-IV-es lamina ventralis határát egy, a felnőtt patkányoknál leírt ívelt vonallal választottuk el az V-VI-os lamináktól, ami lateralisán a hátsó szarv nyaki behúzódtól indul, és a medialisán a funiculus posterior alsó határának és a canalis centralis távolságának felezőpontjánál végződik. A canalis centralis felső pontján átfektetett horizontális vonaltól lefelé terjedő szürkeállományt egységesen, mint VII-X-es laminák kezeltük. A fehérállományt funiculus dorsalisra (DF), lateralisra (LF - *a funiculus dorsolateralis (DLF) is ide tartozik, bár elemzéseinkben külön ezt a régiót nem vizsgáltuk*) és ventralisra (VF) határoltuk el a be- és kilépő gyökök alapján. A fent leírt beosztás alapján a nyúlványok helyének meghatározását mind az ipsi-, mind a contralateralis oldalon elvégeztem.

A hátsó szarv I-IV lamináit magában foglaló területet medialis és lateralis félre osztottam a hátsó szarv felszíni kontúrjának középpontjára állított merőleges vonallal annak érdekében, hogy meghatározzam (a kizárólag lateralis elhelyezkedésű) neuronjaink milyen mértékben fogadnak bemeneteket a medialis félből és küldenek kimenetet oda.

## *Sejtszimmetria elemzése*

A sejtek axon és dendritfa szimmetriáját mediolateralis és rostrocaudalis irányokban határoztam meg. Ezt a vizsgálatot a többek között a gerincvelői hátsó szarv ismert mediolateralis aszimmetriája (pl. medialis gyökérbelépési zóna vastag afferenseinek jelenléte) tette indokolttá. A mediolateralis (ML) szimmetria esetén a gerincvelő dorsalis felszínére, a vizsgált neuron szómájának középpontjára állított merőleges vonal jelölte ki a szimmetriatengelyt, míg a szomszédos metszeten a szimmetriatengelyt ugyanebben a pozícióban vettem fel és határoztam meg a medialis és lateralis szimmetriarészben elhelyezkedő nyúlványok mennyiségét. A rostrocaudalis (RC) szimmetria meghatározásakor szimmetria síknak azt a z-értéket vettem, ahol a sejtestest kontúrja a legélesebben rajzolódott. Mivel a NeuroLucida szoftver a z-tengely mentén is (az x- és y-tengely mellett) rögzíti az adatpontokat, ortogonális nézetben lehetőség van ún. „z-szűrést” elvégezni, aminek segítségével jelen esetben a szómát figyelembe véve a kirajzolt neuron nyúlványdarabjait rostralisán és caudalisán el tudtuk különíteni.

A szimmetriavizsgálatok kombinálásával ezt követően a szóma körüli teret 4 részre osztottam: rostromedialis (RM), rostrolateralis (RL), caudomedialis (CM) és caudolateralis (CL) és ezekben is meghatároztam a dendriték és axondarabok arányát, az egymáshoz viszonyított elhelyezkedését.

## *Statisztikai elemzés*

Az összehasonlíthatóság céljából a nyúlványhosszak abszolút értékei helyett, ahol csak lehetett, a sejt teljes nyúlványhosszára normalizálva tüntettük fel a számadatokat. Minden eredmény átlag  $\pm$  az átlag szórása (SEM- *standard error of the mean*)-ként van megadva. A statisztikai elemzéseket Origin 9 szoftverrel végeztük el (Microcal Software, Northampton, MA, USA), ahol a sejtek aszimmetria összehasonlítása esetén one-way ANOVA-t, a laminákon belüli megoszlás különbségének meghatározásához Mann-Whitney tesztet használtunk.

## 4. EREDMÉNYEK

PhD munkám fő célja fiatal patkány gerincvelő hátsó szarvának felszínes lamináiban található neuronokhoz tartozó axonkollaterálisok és dendritfák lamináris eloszlási mintázatainak vizsgálata volt. Összesen 317 neuronból kiválasztott 34 sejt összehasonlító elemzését végeztem el teljes sejtrekonstrukció elvégzését követően: ebből 25 db az I-es laminában helyezkedett el (10 projekciós neuron és 15 interneuron), míg további 9 (antenna) sejt a III-as laminában foglalt helyet.

A szövettani feldolgozást követően a transversalis metszetek eltérő torzulása és zsugorodása általában a rövid nyúlványszakaszok pontos illesztését és ennek következtében a nyúlványok összekötését nem tette lehetővé, emiatt jelen elemzés eltér témavezetőm korábbi munkáiban elvégzett morфомetriai analíziseitől. Ugyancsak technikai megfontolásból a disszertációmban a rostrocaudalis kiterjedés analízisére nem térünk ki részletesen, mivel ezek az értékek valószínűleg alulbecsültek, ugyanis a vizsgált sejtek 73,5%-a (25 sejt a 34-ből) rendelkezett egy vagy több olyan nyúlvánnyal, ami a blokk egyik vagy mindkét végét elérte. Újfajta elemzési metodikánk ugyanakkor eddig nem ismert morfológiai sajátosságokat tárt fel a gerincvelő hátsó szarvának felszínes neuronjaival kapcsolatban.

### *I-es lamina sejtek*

#### **Projekciós neuronok**

Az I-es laminában található projekciós neuronok fő jellegzetessége, hogy az ellenoldali anterolaterális fehérállományban felszálló főaxonnal rendelkeznek, ami közvetlenül indul ki a sejttestből vagy egy fődendritből. Ezt a jellegzetességet használtuk fel a projekciós és interneuronok elkülönítésére ebben a dolgozatban. A kirajzolt sejtek közül 9 projekciós sejt főaxonja keresztezte a commissura anterior-t és az ellenoldali anterolaterális oszlopban haladt tovább (ALT-PN), míg egy esetben a főaxon átlépése nem volt vizualizálható, mivel elhalványult az V-ös lamina magasságában még az átlépés előtt. Kezdeti szakaszának megjelenése azonban nagymértékben hasonlított a másik 9 vizsgált projekciós neuronhoz, ezért ezt az idegsejtet is ALT projekciós neuronnak tekintettük.

Mivel a myelinizált főaxon nem létesít kapcsolatot a környező sejtekkel, az elvégzett elemzésekben csak és kizárólag az axonkollaterálisait használtuk fel, hogy a lehető legpontosabb képet kapjunk a sejtek lokális kapcsolatrendszeréről. Egy esetben a vizsgált neuron nem rendelkezett kollaterálissal, itt csak a dendritfájának disztribúcióját vetettük össze a többi sejt azonos paramétereivel.

A rekonstrukciók közben 3 esetben (a 9-ből) egyértelműen találtunk átkereszteződést a commissura posteriorban vagy anteriorban. Ez az új axonkollaterális típus korábban a sagittális metszetekben nem került leírásra, valószínűleg a metszési síkból kifolyólag, mivel egy a síkra merőlegesen futó vékony axonkollaterális elhalványulva nehezen megkülönböztethető.

### Interlamináris megoszlás

Két jellegzetes dendritfa megjelenési típussal találkoztunk a kirajzolt sejtek esetében. Az egyik esetben a dendritfa jelentős része a fehérállományban terült el a hátsó szarv mentén, míg a másik esetben hosszan elnyúlt a szürkeállományban. Ebből a 2 csoportból kiválasztva egy-egy példát elemezve azt kaptuk, hogy dendritjeiknek a preferált területeik hasonlóak, még ha a megoszlási arány el is tér kissé. Az axonjuk megjelenésére kevésbé jellemző ez a hasonló területen való elhelyezkedés, de az LV és LF potenciális célpontot képeznek. Amennyiben összevetjük az ebben a tanulmányban vizsgált összes PN-t, azt vettük észre, hogy a felszínes laminákban az axonkollaterálisok megjelenése kevésbé jellemző, inkább az V-VI-os laminában és a LF-ban jelennek meg, továbbá az ellenoldalra is kiterjedhet. Ezzel szemben a dendritek csak ipsilaterálisan voltak jelen, a dendritfa jelentős mértékben laterálisan helyezkedett el, de medialisán is volt tetten érhető dendritszakasz (a vizsgált esetek 70%-ában).

### Sejtszimmetria

A PN dendritok eloszlásának kismértékű polarizáltsága felvetette, hogy van-e összefüggés a sejtek bemenetét képező dendritok-, és a kimenetet jelentő, lokális célpontokat definiáló axon eloszlási mintázatai között. Ezt az összefüggést a sejtcsoportokon belül az egyes sejtekre vetítve elemeztük, majd a sejtcsoportok között is összehasonlítást tettünk. A vizsgálatához a sejtek körüli teret a szómán keresztül medialis és lateralis, valamint rostralis

és caudalis térrészekre osztottuk fel.

A mediolateralis szimmetriájukat tekintve a vizsgált PN-ek esetében az axonok és dendritek általában azonos oldali dominanciát mutattak és ritkán voltak a szimmetriatengely közelében, azaz viszonylag polarizáltak voltak valamely irányban. Azonban a rostrocaudalis szimmetria vizsgálata alapján a dendritdominancia oldalával ellenkező oldalon volt jellemző az axondominancia, valamint a polarizáltság nagyobb fokú volt a vizsgált PN populációnál. Rostrocaudalis viszonylatban axonkollaterálisok néhány esetben ( $n=3$ ) csak az egyik oldalon jelentek meg, ami azzal magyarázható, hogy a főaxonból kiinduló kollaterális a szómától messzebb ágazott le és sem az a kollaterális, sem további esetleges leágazások nem tértek vissza a szóma térségébe, vagy nem érték azt el.

Az utolsó analízis során a neuron körüli teret a szómát középpontnak tekintve horizontális síkban négy térrészre osztottuk fel és meghatároztuk az adott téregységbe eső axon és dendrit százalékos arányát. Jelen elemzésünk során azonban csak tendenciákat tudtunk felfedezni, a dendrit és axoneloszlás közötti bármilyen korrelációt nem tudtunk tetten érni. Ilyen megfigyelés volt, hogy a dendritből eredő axonok szinte kizárólag mediálisan induló dendritekből eredtek. Az axon legtöbbször caudolateralis dominanciát mutatott, míg a dendritek esetén polarizáltabb és kevésbé polarizált vegyesen fordultak elő. Mind a szomatikus, mind a dendritikus eredetű axonokból kiinduló axonkollaterálisok esetében megfigyelhető volt a kifejezetten laterális irányba polarizált axonkollaterális eloszlás.

Összegezve elmondhatjuk, hogy a vizsgált PN-ok axonkollaterálisainak megoszlása a korábban leírt mintázat-típusokat tükrözi, valamint főként a felszínes laminákban és a DLF-ben elhelyezkedő dendritekkel térbeli megoszlást tekintve egyértelmű korreláció nem volt igazolható.

### **Interneuronok**

A gerincvelő felszínes lamináiban elhelyezkedő neuronok döntő többsége interneuron (az I-es lamina sejtek 90-95%-a), amelyek axonja nem különíthető el egyértelműen főaxonra és lokális kollaterálisra. Az I-es lamina interneuron axonok felhőszerű, több szintű elágazást mutató, sokszor azonos

területekre más-más primer ágából visszatérő sűrű hálózatot képez nagyszámú axon varikozitással. A rendelkezésünkre álló jelölt sejtekből 15 interneuront tudtunk biztonsággal elkülöníteni az I-es laminában, amik megfeleltek a korábban ismertetett feltételeknek.

### Interlamináris megoszlás

Jellegzetesen sűrű axonfelhő jellemezte a vizsgált sejteket, ami főként a felszínes laminákra korlátozódtak. Bár a teljes gerincvelői preparátumban történő elvezetés esetén csak a GV lateralis felszínén lehetséges sejteket megjelölni, ennek ellenére számos IN axon mutatott medialisán is megjelenő axont, egy esetben még a DF-ben is tudtunk követni egy kis szakaszon axont.

Ha összevetjük a régiónkénti axon- és dendritmegoszlást 2 olyan interneuron esetén, ahol az egyiknek jelentős medialis axon kiterjedése van, míg a másik esetben kizárólag lateralis térfélben van axonja, akkor azt vettük észre, hogy nyúlványaik közel azonos területet fednek le: LI, LII, LIII-IV és a lateralis funiculus-t (valamint minimális axon jelent meg az V-VI-os laminában). Ezek közül a legnagyobb mértékben a II-es laminában találtunk axont és dendritet is, mint ahogy ez tetten érhető volt az összes többi interneuron esetén is. Az axon esetén találtunk még nyúlványokat az I-es, III-IV-es laminában, valamint a LF-ben. Ha a felszínes laminák mediolaterális kiterjedésében vizsgáljuk ugyanezt, akkor azt találtuk, hogy a dendritek kizárólag lateralisán helyezkedtek el, míg 13 IN (15-ből) rendelkezett valamennyi axonnal medialisán (0,5% -tól 43,4%-ig terjedően).

### Sejtszimmetria

Az IN-ok dendritszimmetriája mind a mediolaterális, mind a rostrocaudalis irányban nagyon hasonló volt a PN-oknál megfigyeltékhez. A IN-ok 2/3-a rendelkezett dominánsan laterális dendritfával (n=10). Az axon rostrocaudalisán és mediolateralisán is diverz volt szimmetria tekintetében, ugyanakkor nagyobb arányban voltak az axon értékek a szimmetriatengely közelében. Egyértelmű korrelációt nem találtunk, megfigyelhető volt azonban egy tendencia, miszerint az adott oldali dendritdominancia értékhez egy ellenoldali dominanciát mutató axon érték tartozik.

Az IN-ok körüli, horizontális síkban kijelölt 4 térrészben történő nyúlvány-analízis is megerősítette az IN-ek szimmetrikusabb, kevésbé polarizált megjelenését. Eredményeink alapján az IN-ok egyenletesebben fedik le a szóma körüli teret, mind dendritfájukat, mind pedig axonjukat tekintve. Az ellentétes oldali dendrit-/axondominancia jelzésértékűen mutatkozik meg ebben az analízisben. Az IN-ok esetében a dendritekből kiinduló axon nem preferálta a mediális dendriteket, mint a PN-ok esetében, viszont nagyobb számban eredtek ezek az axonok caudalis irányban eloszló dendritekből.

Összegezve az IN-ok általában kevésbé polarizáltak, szimmetrikusabbnak bizonyultak a PN-oknál. A kisebb mértékű aszimmetria ugyanakkor gyakran ellentétes oldali axon- és dendriteloszlással társult.

### ***III-es lamina sejtek***

#### **Antenna sejtek**

Az I-es lamina sejtjeinek kvantitatív morfometriai vizsgálatát főként abból a célból végeztük el, hogy a struktúra részletes feltárásával a neuroncsoportok funkcionális sajátosságaira tudjunk következtetni. A felhasznált, részben általunk kidolgozott új módszerek ugyanakkor egy olyan korábbi munka során kerültek kidolgozásra, mikor egy funkcionális lelet anatómiai alátámasztását végeztük el a III-as lamina sejtjein. Elektrofiziológiai mérések azt sugallták, hogy vannak olyan A $\beta$  és A $\delta$  alacsony küszöbű primer afferensektől bemenetet fogadó III-as lamina sejtek, amelyek axonjaikkal elérik az I-II-es laminát, ahol monoszimpatikus kapcsolatokat létesítve modulálják a helyi ingerület-áttevődést. Ennek az útvonalnak az igazolásához a III-as lamina sejtek, ezen belül is az antenna típusú (ANT) sejtek primer afferens bemenetének szisztematikus vizsgálatát (a diszkusszióban kerül bemutatásra), valamint, saját munkámként azok axon és dendrit nyúlványrendszerének kvantitatív elemzését végeztük el.

Ezen sejtek sajátos morfológiai jellemzője, hogy nagy dorsoventrális kiterjedésű dendritfával rendelkeznek, jellemzően egy dorsalisán a hátsó szarv felszíne felé felnyúló dendrittel, amitől a sejt a kérgi piramissejtekhez hasonló szomatodendritikus megjelenéssel bírnak. Ez a morfológiai sajátosság volt a kiválasztási kritérium ennek a sejtcsoportnak az analízisének.

### Interlamináris megoszlás

A vizsgált ANT sejt nyúlványeloszlását laminánként megvizsgálva a dendritek, bár eltérő mennyiségben, de ugyanazokat a laminákat preferálták. Az axonok esetében azonban két elkülönülő mintázatot mutattak. Míg a III-IV és V-VI laminákban rendelkeznek axonnal, addig a felszínes I-es laminában nem minden esetben. Akárcsak a PN-ok és az IN-ok esetében, a DLF területén is találtunk axonokat, de lényegesen kisebb arányban és gyakorisággal, mint az I-es lamina sejtjeinek esetében.

Kiemelendő, hogy mind a dendritek, mind az axon tekintetében a hátsó szarv lateralis fele az, ahol a nyúlványok koncentrálnak, a 9 ANT közül mindössze 3 esetben találtunk minimális arányú axonszakaszt, ami a medialis irányba terjedt ki (0,4-9,5%-ig).

### Sejtszimmetria

A számára, mint középpontra viszonyított szimmetria-analízis az ANT sejteknél mutatta a legeggyöntetűbb aszimmetriát, különösen az axonok tekintetében. Dominánsan lateralis és rostralis megoszlást mutattak, míg a dendritek, egy kiugró eset kivételével, szimmetrikusabb elrendeződésűnek bizonyultak mindkét tengely mentén.

A számára centrált horizontális síkban vizsgált eloszlás, bár viszonylag homogén, de szintén tükrözte a rostralis és lateralis dominanciát. Érdekes megfigyelés volt továbbá, hogy az ANT sejtek dendritikus eredetű axonjai minden esetben medialis irányban elhelyezkedő dendritből eredtek.

Összegezve elmondhatjuk, hogy az ANT sejtek kiválasztásához használt dendritmorfológiai kritérium alapján várható egységes dendritparaméterek mellett az axonok 2 elkülönülő axonmegoszlási mintázatot mutattak: egyes esetekben az axonágak elérték az I-es laminát (n=4), míg a többi (n=5) esetben az axon főként a III-IV-es laminákban, valamint a DLF-ben helyezkedett el.

## *A vizsgált esetek összehasonlító elemzése*

Bár az előző fejezetekben bemutatott I-es és III-as laminában található neuronjaira kifejezett morfológiai diverzitás volt jellemző sejtcsoportjaikon belül, volt pár karakterisztikusan megjelenő tulajdonság, amik eltérővé tették ezeket a sejtcsoportokat. Emiatt fontosnak tartottuk a három vizsgált neuronpopuláció egymással való összehasonlítását, a korábban vizsgált paraméterek tekintetében.

A lamináris megoszlások összehasonlítása alapján a PN-ok inkább a mélyebb laminákban adnak axonkollaterálisokat (V-VI), míg az IN-ok és ANT sejtek axonjai főként felszínesen (I-IV) maradnak. A DLF dorsalis része mindhárom sejtcsoportnál jellemző célpont volt. A teljes axonhossz az IN-ok esetében volt a legnagyobb, közel háromszorosa a PN és ANT sejtek kevésbé kiterjedt axonhálózata esetében mérttel. Az axonvarikozitások megoszlása közel azonos volt minden laminában, kivéve az alól csak az ANT sejtek képeztek, ahol volt néhány kiugróbb érték, elsősorban azokban a laminákban, ahol az axon nagyobb százalékban volt fellelhető. Contralateralisan elhelyezkedő axonkollaterálisokat nagyobb számban a PN sejtek esetén láttunk ( $n=3$ , míg 2 további esetben az axon megindult abba az irányba). Az IN esetén egy esetben találtunk kereszteződést, míg az ANT sejteknél egy sejt axonja megközelítette a középvonalat, de nem lépte azt át.

A három neuroncsoport dendritjeinek százalékos megoszlása a szómák elhelyezkedése alapján a várt laminákra koncentrált. Ez a PN-ok és IN-ok esetén főként az I-es, II-es laminát, valamint a DLF-et jelentette, míg az ANT sejtek inkább a II-III-as laminákat foglalták el. Az összdendrit-hossz az IN-ok és ANT sejtek esetében hasonló volt (átlag  $IN=3192,5 \pm 372,4$ , valamint átlag  $ANT=2991,6 \pm 371,3 \mu m$ ), míg a PN-ok dendrit-hosszúsága ennél valamennyivel hosszabbnak bizonyult (átlag  $PN=3967,1 \pm 518,2 \mu m$ ), azonban rostrocaudalisan az antenna sejtek látszólag nagyobb területet fedhetnek le.

A szómára centrált mediolaterális és rostrocaudalis irányokban vizsgált szimmetriát tekintve, mind az IN-ok, mind az ANT sejtek szimmetrikusabbnak bizonyultak (közelebb a szimmetria középponthez - hasonló mennyiségű dendrit/axon mindkét irányban), mint a PN csoport sejtjei.

A mediolateralis irányban a PN-ok és ANT-ok gyakrabban mutattak azonos irányú dominanciát dendritjeik és axonjuk tekintetében (ún. homológ megoszlás: pl. lateralis dendritdominanciához társuló lateralis axondominancia). Az IN-ok esetében mediolateralis irányban a heterológ megoszlás volt a jellemző, azaz a dendritdominancia oldalához képest az ellenoldalon domináló axon. A projekciós neuronok esetén sokszor találtunk olyan esetet, ahol az axonkollaterálisok kizárólagosan az egyik térfélben helyezkedtek el. A lateralisán elhelyezkedő ANT és PN sejtekénél a szóma helyzete a nyúlványrendszer dominánsan lateralis elhelyezkedésével társult, az IN-ok esetében ez a tendencia nem volt megfigyelhető, a nyúlványok mind medialisán, mind lateralisán hasonló arányban domináltak.

Rostrocaudalis irányban rostralis preferencia volt felfedezhető az ANT sejtek esetében. A rostrocaudalisán inkább heterológ eloszlást mutató polarizáltabb (kifejezetten rostralis vagy caudalis dominancia) PN-ok hasonló mértékben mutattak rostralis és caudalis preferenciát. Az IN-ok ebben az irányban is homogénebb, változatos dominancia értékeket mutattak.

A sejtek szimmetria-értékei nem mutattak összefüggést sem azok tüzelési mintázatával, sem pedig szomatodendritikus morfológiai beosztásukkal.

## 5. MEGBESZÉLÉS

Jelen dolgozatban bemutatott munkám során 34, teljes sejt patch-clamp technikával jelölt neuron 3D rekonstrukcióját végeztük el fiatal patkány gerincvelőjének lumbalis szakaszán. Célunk azon finom anatómiai különbségek feltárása volt, amik pusztán a sejt szomatodendritikus megjelenéséből nem egyértelműek, ugyanakkor meghatározóak lehetnek a sejt hálózati szerepe szempontjából. Ilyen paraméternek tekintettük a dendritek és axonok lamináris eloszlását a sejtesthez viszonyított helyzetét, amik a neuronok bemeneteit és célpontjait nagymértékben meghatározzák.

Elemzéseinkhez az elektrofiziológiai mérések során biocytinnel jelölt neuronokat használtunk, amiket portugál kollaborációs partnerünk bocsátott a rendelkezésünkre; korábban az itt felhasznált sejtek morfológiai elemzésére nem került sor. Jelen munkában az I-es lamina projekciós (n= 10) és interneuronjait (n= 15), valamint a III-as lamina antenna sejtjeit (n= 9) vizsgáltuk. Az eltérő analizált esetszámok részben az eredeti munkák eltérő esetszámából adódnak, részben pedig abból a tényből, hogy nem minden előhívott sejt felelt meg az analíziseinkhez szükséges feltételeknek. Megjegyzendő, hogy a morfológiai vizsgálatra használt sejteket eredményező elektrofiziológiai mérésekben nem vettem részt (továbbá a témavezetőm által elvégzett kísérletsorozat során sem), ugyanakkor ezen eredmények ismertetése elengedhetetlen lenne morfológiai eredményeink értelmezéséhez, ezért ezek ebben a fejezetben kerülnek bemutatásra.

Az alábbi főbb morfológiai különbségeket és sajátosságokat tártuk fel jelen munka során: (1) a projekciós neuronok axonkollaterális mintázata egy dorsoventralis irányú információáramlást sugall, míg (2) az interneuronok axonja ezzel szemben inkább a lateromedialis információáramlást segítheti. (3) Az antenna sejtek kompaktabb megjelenéssel rendelkeztek, mint a másik 2 vizsgált típus. Esetükben az axon vizsgálata feltárta, hogy (4) rendelkezhetnek az I-es laminát elérő axonhálózattal. Végezetül (5) mindhárom sejt rendelkezett bizonyos mennyiségű axonnal a funiculus lateralis-ban (az I-es lamina esetében mindnek). Utóbbi megfigyelés megerősíti munkacsoportunk az I-es lamina sejtek esetében tett korábbi eredményeit. A funiculus lateralisban található kollaterálisok (amik szinte kizárólag a DLF területén voltak jelen) helyi információkat továbbíthatnak a

szomszédos szegmentumokba, valamint a nucleus spinalis laterisba. Antal és mtsai. (2016) közleményükben erőteljes poliszinaptikus gerjesztést értek tetten a DLF régiójában preszinaptikus I-es lamina projekciós sejt stimulálását követően. Úgy vélték, hogy a jelenség mögött egy olyan serkentő interneuronokból álló hálózat állhat, ami a „feedforward” serkentésen keresztül felerősíti és tovább küldi a projekciós neuron aktivitását.

### ***Technikai megfontolások***

Bár az elektrofiziológiai elvezetéseket intakt gerincvelői blokkpreparátumban végezték, az esetek 73,5%-ban az axon kilépett a blokk egyik vagy mindkét oldalán, emiatt munkám elsősorban a mediolateralis és interlamináris eloszlásokra fókuszált és a rostrocaudalis kiterjedés mértékéről csak minden bizonnyal alulbecsült, megközelítő értékeket közlünk. Továbbá, bár jelentős hangsúlyt fektettünk a lehető legjobb töltéssel rendelkező sejtek kiválasztására, nem mindegyik jelölés volt egyforma, a követhetőség pedig ennek függvényében változhatott.

Fitzgerald munkatársaival több ízben is bizonyította, hogy a primer afferens bemenetek kapcsolatai változnak patkányban a kor előrehaladtával. A mért és jelölt neuronjaink fiatal, 9-20 napos patkányokból származnak, mivel az előrehaladott myelinizáció miatt az intakt patkány gerincvelőn végzett patch-clamp méréseket idős állatokban nehéz kivitelezni. Eredményeink interpretációjánál tehát azt is figyelembe kell venni, hogy egyes morfológiai megfigyeléseink, különösen a mediolateralis nyúlványeloszlásra vonatkozóak a kismértékben reorganizálódó primer afferens bemenetek anatómiai hatásai miatt változhatnak. Ezen túlmenően, a felszínes laminák laterálisan könnyebben megközelíthetőek ennél a technikánál, emiatt a mérések és következményesen a jelölt sejtek elhelyezkedése is döntően laterális.

## Projekciós neuronok

### Contralateralisan megjelenő axonkollaterálisok

A PN-ok kollaterális-típusait vizsgáló korábbi munkákban a rekonstrukciókhoz használt metszetek a sagittalis síkban készültek így, a 3D rekonstrukció ellenére sem adtak részletes és teljes képet az interlamináris nyúlványeloszlásokról, és valószínűleg ezért nem fedték fel azt a transversalis metszetek esetén egyébként jól követhető kollaterális típust, ami a commissura dorsalisban lépi át a középvonalat, vagy amelyik a contralateralis oldalon ágazik el a főaxonból. Munkám során transversalis metszetekből készült rekonstrukciókon a PN-ok 1/3-nál találtunk axont a contralateralis oldalon, illetve egy esetben egy IN axonág is átlépett a contralateralis oldalra. Ez a megfigyelés mindenképpen rámutat arra, hogy teljes 3D rekonstrukciók nélkül (lehetőleg több síkban készült metszetekből) a bonyolult lefutású axonok pontos eloszlása és finomszerkezete nehezen megismerhető.

Hasonló lefutású axonokat már korábban is leírtak a III-IV-es laminák laterális felébe szúrt BDA (biotinilált dextranszamin) injekciókat követően, bár akkor ezek eredetként a felszínes hátsó szarv sejtjei nem kerültek fel. Ugyanakkor a lateralisán elhelyezkedő PN-ok dendritjei, ahogy azt a dendrit részletes eloszlásvizsgálata feltárta, nagy számban küldenek a DLF dorsalis és oldalsó részébe is, ami igen közel esik a Petkó és Antal által adott BDA injekció helyéhez, így valószínű, hogy az I-es lamina PN-ok is felvehették a jelölőanyagot. Az általunk rekonstruált átkereszteződő kollaterálisokon megfigyelt varikozitások szinapszisokat adhatnak a X-es lamina sejtjein, amelyek között többféle vékony primer afferens rostból származó mono- és poliszinaptikus bemeneteket integráló, a nocicepcióban fontos szerepet játszó sejtek is vannak. Mivel az I-es lamina projekciós sejtjeinek ventralis kollaterálisai az V-ös laminában található további felszálló pályák eredő sejtjeiként funkcionáló neuronokat is innerváltak (ipsilateralisan), ésszerű lehet azt feltételezni, hogy a PN-ok összehangolhatják, vagy legalábbis tájékoztathatják az egyéb modalitások feldolgozásáért felelős gerincvelői neuronokat, vagy akár az összes protopathias ingereket szállító felszálló rendszer sejtjeit.

## **A ventralis PN kollaterálisok aktiválhatják a mélyebb laminákban található hátsó szarvi neuronoknak (*Kiegészítő elektrofiziológiai kísérletek*)**

A PN axonkollaterálisokról kapott, dorsoventralis információáramlást sejtető morfológiai eredményeinket jól alátámasztják témavezetőm korábbi elektrofiziológiai leletei. Ebben a kísérletsorozatban 6-15 napos Wistar patkány gerincvelői szeleteken történtek teljes-sejt patch-clamp mérések az V-VII laminák neuronjain, miközben a felszínes hátsó szarv neuronjait farmakológiailag SP-vel (P anyag) aktiválták.

Neurokinin-1 receptort az I-es lamina neuronjainak közel 45%-a expresszál, jelentősebb hányaduk valószínű serkentő sejt. A PN-ok mintegy 80%-a fejezi ki a NK1R-t, de az IN-ok is mutathatnak gyenge NK1R pozitivitást, és egyharmaduk szintén reagál SP-re. Ez a hatás azonban kisebbnek bizonyult, mint a PN-oknál tapasztaltak. A SP használatát követő depolarizáció időbeli lefolyása arra utalhat, hogy funkcionálisan szignifikáns a különbség a PN és IN NK1R expressziója között. A NK1R-on keresztül kialakuló SP aktiváció a szeletben az EPSP-k (serkentő posztszinaptikus potenciál) számának nagymértékű emelkedését váltotta ki VII-X-es laminákból elvezetett sejteken. Ez a hatás blokkolható volt mind szelektív NK1R antagonistával (SR140333), mind tetrodotoxinnal. Utóbbi kizárta a preszinaptikus NK1R aktivációnak lehetőségét. A ventralis információáramlás morfológiai hátterének alátámasztásaként pedig az ipsilateralis hátsó szarv tövénél végzett mechanikai szeparációja után a SP többé nem tudta kiváltani az EPSP-k számbeli növekedését.

Megfigyelésünk, miszerint csak a magasabb koncentrációjú NK1R antagonistá volt képes blokkolni a SP által kiváltott ventralis irányú serkentést, azt jelezheti, hogy az I-es lamina interneuronjainak (gyengébb NK1R expresszióval) hozzájárulása valószínűleg kisebb, mint az NK1R-ban gazdagabb PN-oknak. Ennek ellenére hipotézisünk szerint mind a PN-ok, mind az IN-ok hozzájárulhatnak az anterolaterális felszálló rendszer összekapcsolásához más felszálló útvonalakkal. Ezt erősíti az a megfigyelés, hogy a hátsó szarv mechanikai szeparációja megakadályozza a SP által kiváltott EPSP számbeli fokozódást a mély hátsó szarvi és ventralis laminákban. Morfológiai eredményeink azt sugallják az előzőekben bemutatott elektrofiziológiai eredmények tükrében, hogy az axonjukat

főként a felszínes laminákra koncentráló IN-ok inkább indirekten befolyásolják a mélyebb laminák hálózatát más közbeiktatott interneuronokon keresztül. Ezzel szemben a PN-oknak jelentős mennyiségű kollaterális hálózata jelenik meg a mélyebb laminákban, amiken keresztül direkt módon is befolyásolhatják akár a motoros hálózatok interneuronjait, akár a motoneuronok dendritjeit, amelyeken akár közvetlenül monoszinaptikus kapcsolatot is képezhetnek.

### **A PN-ok V-VII-es laminába küldött kollaterálisainak serkentő hatása közreműködhet a nociceptív flexor reflex kialakításában**

A közelmúltban számos transzgenikus egértörzsekben hátsó szarvi interneuron típusokat célzó kísérletsorozat igazolta a mélyebb laminákból a felszínes laminák felé történő információáramlást, mind normál, mind pathológiás állapotokban. A fájdalom transzmissziójának klasszikus, és újabb kapu-kontroll teóriái is a II-III-as lamina interneuronjait anatómiai "kapunak" tekintik a különböző szenzoros modalitásokat szállító primer afferensek között. Az I-es lamina neuronjai, kiterjedt axonális kapcsolataik ellenére eddig ezekben a somatikus hálózatokban nem jelentek meg. Munkacsoportunk korábbi közleményeiben leírt hipotéziseket elsőként Browne és munkatársai támogatták közleményükben, ahol a PN-ok kollaterálisait, mint a gerincvelői fájdalominformáció feldolgozásában részt vevő, eddig mellőzött játékosként említik. A szerzők rámutatnak, hogy a kollaterálisok további lehetséges funkciói lehetnek a "feedforward" serkentés, valamint bizonyos gátló interneuronokon keresztül, indirekt módon megvalósuló gátlás is. A "feedforward" serkentést szomszédos PN-ok között egy direkt bizonyítékot szolgáltató közlemény igazolja, amelyben elektrofiziológiai mérés során találtak szinaptikusan összekapcsolt I-es lamina PN-okat. A fentiekben bemutatott gerincvelői szeleteken történt mérések további bizonyítékot szolgáltatnak az I-es lamina sejtek "feedforward" serkentésben való részvételére. A mély hátsó szarv és az intermedier szürkeállomány területén a kollaterálisok célpontjaiként felmerülnek az utolsó rendű premotoros interneuronok is, amelyeken keresztül a szenzoros aktiváció a motoneuronokat is eléri, potenciálisan hozzájárulva a nociceptív flexor reflex kialakulásához. A mély laminákban található WDR neuronok is képezhetik az I-es lamina PN-ok ventralis irányú kollaterálisainak célpontját, ilyen módon a nociceptív bemenetet szolgáltatva

a supraspinalis központ felé továbbított integrált kimeneteikhez. Végül pedig, mind a tractus spinocerebellaris eredő neuronjai, mind az autonóm szimpatikus preganglionáris neuronok a thoracolumbaris szegmens laterális szarvában fogadhatnak szinaptikus bemeneteket a PN kollaterálisoktól.

## **Interneuronok**

### **Dendrit és axon megoszlási mintázat és funkcionális aszimmetria a gerincvelő hátsó szarvának felszínes lamináiban**

Az I-es lamina sejtjei a hátsó szarvban a későn kifejlődő neuronpopulációba tartoznak. Míg a korábban születő dorsalis neuronok főként ventrolateralisan vándorolnak és találják meg a mélyebb laminákban végső elhelyezkedési területüket, addig a későn születő neuronok inkább dorsolateralisan vándorolnak és a felszínesebb laminákban helyezkednek el. Ezek a postmitotikus sejtek migrációjuk során nyújtják ki neuritjeiket, tangenciálisan az I-es lamina vékony sávjában, szoros kontaktusban maradv a TrkA+ (tropomyosin receptor kinase A) szenzoros afferensekkel. Dendritjeik és axonjuk végső elrendezése térben korlátozott, hiszen a dorsalis felszín közelsége és a primer afferensek nagy sűrűsége a dorsalis gyökér belépési zónájában csak ventralis irányban teszi lehetővé a terjeszkedést. Ennek következtében az I-es lamina neuronjainak esetében egyfajta dorsoventralis aszimmetria jellemző és mind a PN-ok, mind az IN-ok rendelkezhetnek ventralis irányú dendritekkel. Ezeknek a ventralisan lenyúló dendriteknek a jelenléte vagy hiánya az I-es lamina sejteket két kategóriába sorolja, amelyek különböző módon végződő primer afferens rostokból kaphatnak bemenetet és különböző modalitásokat dolgozhatnak fel.

Bár az I-es lamina neuronok nyúlványainak mediolateralis és rostrocaudalis növekedése kevésbé korlátozott, azonban eddig még fel nem tárt anatómiai akadályok ezekben az irányokban is létezhetnek. A dorsalis gyökér belépési zónájának medialisán belépő vastag primer afferensek sűrű kötegei például képezhetnek fizikai akadályt az I-es lamina neuronok növekedési folyamataiban. Erről az anatómiai és funkcionális mediolateralis irányú aszimmetriáról már korábban is beszámoltak az I-es lamina sejtek esetében. Lézerszkennelő fotostimulációval bizonyos neuronok serkentő bemeneti zónái markáns medialis aszimmetriát

mutattak, amelyek egyeztek a neuronok dendritikus mezőinek strukturális aszimmetriájával. Ugyanennek a munkacsoportnak egy későbbi eredménye, hogy a hátsó szarv medialis és lateralis része a lokális elektromos stimulációra adott válaszaiban különbözik, ami belső felépítéséből, például a helyi kapcsolatok irányából ered. Hipotézisük az volt, hogy a felszínes hátsó szarv medialisabb neuronjai hajlamosak serkentő szinaptikus kapcsolatokat létesíteni a tőlük lateralisán elhelyezkedő neuronokkal és ez az irány megfordulhat lateralis irányba haladva. Morfológiai eredményünk, miszerint a lateralisán elhelyezkedő IN-ok heterológ eloszlást mutatnak dendrit- és axondominancia tekintetében, kiválóan alátámasztja ezt a korábbi feltételezést.

Az I-es lamina egyes neuronjai rendelkeznek olyan varikozitást tartalmazó axonszakasszal, amik átfednek az ott található neuronok dendritfája által elfoglalt területtel. Jelen munkában azt találtuk, hogy az IN-ok nagy részében az axon a dendritfa körül foglalt helyet. Az IN-ok egy viszonylag elkülönülő csoportjánál ugyanakkor a medialisán is kiterjedt axon, lateralisán maradó dendritekkel társult. Ezt az axonkonfigurációt korábban már sagittális metszetből történő rekonstrukció esetében is leírta munkacsoportunk, de alapos megértéséhez nagyon hasznos adalékot képeznek a transversalis metszetekből történt rekonstrukciók. Mélyebb laminákban korábban szintén igazoltak hasonló mediolateralis és lateromedialis projekciók jelenlétét, de a projekciók eredő sejtjeit nem sikerült azonosítani. Egy a közelmúltban a kisugárzó fájdalom szindrómát és bizonyos fejfájástípusokat vizsgáló tanulmányban, a vizsgálatot végző kutatók arra következtettek, hogy specifikus hátsó szarvi neuronok képesek a lateralis és medialis primer afferens bemenetek belépési zónáit összekapcsolni és mint egy anatómiai alapként szolgálnak a kisugárzó fájdalom és a lateromedialis információáramlás biztosításához. Erre a hipotézisre bizonyítékként szolgálhatnak a jelen munkában leírt mediálisan átívelő axonhálózattal rendelkező IN-ok, melyek lateromedialis irányú információáramlást biztosíthatnak. Ezt az elképzelést erősíti meg az is, hogy a legtöbb IN heterológ axon/dendrit eloszlást mutatott. Természetesen nem zárható ki, hogy ezek a polarizált neuronok, amelyek medialis axonnal és lateralis dendritfával rendelkeznek, szélsőséges példái lennének a lateromedialis információáramlásnak. Ugyanakkor ez felveti annak a lehetőségét, hogy a medialisán elhelyezkedő IN-ok axonjai hasonló módon elérhetik a hátsó szarv lateralis szélét, vagy akár a lateralis fehérállományt

is. A kollaborációs partnerünk és munkacsoportunk által használt in vitro gerincvelői blokkpreparátum azonban kevésbé alkalmas medialisan elhelyezkedő neuronok elvezetésére és vizsgálatára, azért ennek a felvetésnek az igazolásához más kísérleti megközelítés lesz szükséges.

Az IN-ok esetében már számos neurokémiai markereken vagy genetikai háttéren alapuló osztályozás áll rendelkezésre az irodalomban. Kívánatos lenne az általunk feltárt morfológiai jegyeket ezekkel a beosztásokkal összevetni, azonban ezek a klasszifikációk döntő többsége egerekben végzett kísérletekből származik, ami a fajok közötti esetleges eltérések miatt akadályt képezhet. Másik akadálya az összevetésnek, hogy a mi morfometriai vizsgálatainkhoz a lehető legrészletgazdagabb, mindamelllett stabil jelölésre volt szükségünk a hosszantartó rekonstrukciók elvégzése miatt. Rendelkezésünkre olyan előhívott sejtek álltak, amiket a klasszikus tormaperoxidáz-DAB reakcióval tettek láthatóvá, és ez megfelelt a fent ismertetett tulajdonságoknak.

Eseteinkben azonban nem találtunk korrelációt a vizsgált paramétereink és a szomatodendritikus típus, valamint tüzelési mintázat összevetésekor, ennek ellenére úgy gondoljuk, hogy ezek a paraméterek (esetlegesen egy nagyobb esetszám vizsgálata esetén) segíthetnek az I-es lamina sejteinek pontosabb funkcionális csoportokba való besorolásában.

## *Antenna sejtek*

### **Morfológiából adódó sajátosságok**

Az ANT sejtek vizsgálata során végzett mérésoroztatban a jelölt III-as lamina sejtek körülbelül 8%-a bizonyult antenna sejteknek, amelyek kivétel nélkül a kisebb méretűek közé tartoztak. Bár széleskörben elfogadott tény, hogy az antenna sejtek a projekciós neuronok közé tartoznak, az itt bemutatásra került neuronok egyike sem rendelkezett az ellenoldalra átlépő főaxonnal, annak ellenére, hogy a vizsgált sejteink szomatodendritikus jellege megegyezett az antenna sejtek leírásával. Az ANT sejteknek igen kiterjedt dorsoventralis irányú dendritfájuk van, ami széleskörű integratív funkcióra utal. Dorsalis dendritjeik számos szinapszist kapnak primer afferensektől, valamint spinalis interneuronoktól, míg a ventralis dendritek

inkább a belső gerincvelői hálózat axonjaival, valamint mélyebb laminákban végződő primer afferensekkel létesítenek kapcsolatot. Egységes megjelenésük tehát valószínűsíti, hogy ugyanolyan szenzoros bemenetektől kapott információkat dolgoznak fel.

A III-V-ös laminában elhelyezkedő neuronok axonjairól ismert, hogy vagy a sejttestjük közelében ágaznak el, vagy egy ventralisan induló axonjuk ágazik el, majd fut rostralisán és caudalisán. Jelen munkában a vizsgált antenna sejteink axon eloszlásuk alapján 2 csoportra voltak oszthatóak. Egy esetben az axon főként a sejttest közelében és mélyebb laminákban foglalt helyet, valamint a funiculus dorsolateralis-ban, míg a másik csoport esetében az axonhálózat elérte az I-II-es laminát. Habár a felszínes laminákig eljutó axon mennyisége általában csekély volt, mégis magában hordozza a lehetőséget, hogy szinapszist képezzenek az I-es lamina sejtek ventralis dendritjein. Mivel a ventralis dendritekkel bíró ún. multipolaris szomatodendritikus morfológia elsősorban az I-es lamina IN-ok jellemzője, ezért az ezt a morfológiát ritkábban mutató PN-ok valószínűleg kisebb eséllyel lesznek az ANT sejtek dorsalis axonjának célpontjai.

### **Az antenna sejtek axoneloszlása nem mutat egyértelmű korrelációt primer afferens bemeneteikkel (*Kiegészítő elektrofiziológiai kísérletek*)**

Hátso gyökér stimuláció során kiderült, hogy a sejtek axoneloszlási mintázata nem mutat egyértelmű korrelációt azok primer afferens bemeneteinek típusával. A neuronok, melyek axonjának bizonyos százaléka (2-13,4%) megjelenik az I-es laminában, sok esetben kapnak A $\delta$  és C bemenetet, de ugyanez jellemző a sejttest körül koncentráló axonnal rendelkező ANT sejtekre is. A mérés során a vezetési sebesség és az aktiválási küszöbérték figyelembevételével a primer afferens bemeneteket alacsony és magas küszöbüre osztották tovább kollaborációs partnereink.

Az A $\beta$  afferensek a III-VI-os laminákban végződnek és alacsony küszöbű mechanoreceptorként működnek. Ebből adódóan feltételezhető lehetne, hogy az antenna sejtek proximalis vagy ventralis dendritjeit célozzák meg. Ennek ellenére, a vizsgált ANT sejtek ritkán fogadtak monoszinaptikus A $\beta$  bemenetet, ami egybe is vág azokkal az immuncitokémiai adatokkal, amelyek viszonylag alacsony számú szinaptikus kapcsolatot mutattak a vastag myelinizált rostok és az NK1 pozitív antenna sejtek dendritjei között.

A megfigyelt A $\delta$  rost bemenetek ugyanakkor aktiválási küszöbértékeik alapján valószínűleg két primer afferens populációtól, az A $\delta$  nociceptoroktól és az alacsony küszöbű A $\delta$  mechanoreceptoroktól származott.

Az alacsony küszöbű A $\delta$  afferensek, beleértve a szórtüsző afferenseket is, a III-as laminában végződnek, így ezek az A $\delta$  afferens rostok is elérhetik az antenna sejtek mélyebb laminákban található dendritjeit. Az A $\delta$  nociceptorok az I-es és V-ös laminában végződnek, felszínes tagjai az antenna sejtek dorsalis dendritjein képezhetnek szinapszisokat. Ezzel az adattal egybeesik az a tény, hogy kollaborációs partnereink elektrofiziológiai méréseiben az A $\delta$  nociceptorként azonosított ANT sejt bemenetek küszöbértéke egybeesett az I-es lamina PN-ok és IN-ok esetén mértékkel.

A vizsgált ANT sejtekben megfigyelhetőek voltak magas küszöbértékű A $\delta$  bemenetek, így feltételezhetjük, hogy az ANT sejtek a magas küszöbű A $\delta$  afferenseket az I-es laminába nyúló dorsalis, míg az alacsony küszöbű A $\delta$  bemenetet elsősorban a sejttest körüli, mélyebb laminákban előforduló dendritjeiken fogadják.

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a III-as lamina sejtek dorsalis dendritjei a II-es laminán áthaladó szakaszukon vékony nem-myelinizált C rostokkal alakítanak ki szinapszisokat. Elektrofiziológiai méréseink is igazolták, hogy az ANT sejtek erős bemenetet kapnak olyan primer afferensektől, amelyek C rostokra jellemző aktiválási küszöbbelés vezetési sebességgel bírtak. Ezek a bemenetek hatékonyan váltottak ki tüzelést, ami hasonló volt a mély hátsó szarvi neuronok és néhány kisméretű I-es laminában található neuron nociceptív stimulusra adott válaszához. Az itt megfigyelt elnyújtott tüzelést nyilvánvalóan segítette a tónusos tüzelési mintázat, amik fontosak a hosszantartó szinaptikus kapcsolatok akciók potenciál-kisülések sorozatává történő átalakításához.

Az ANT sejtek dorsalis és mélyebb dendritjeire esetlegesen szegregált módon érkező primer afferens bemenetek különösen érdekessé teszik azt a tényt, hogy nem mindegyik ANT-sejt axonja jut fel a felszínes laminákba. További részletes kutatásokat igényel majd annak a tisztázása, hogy a felszínes axonok bármilyen módon szelektálják- vagy modulálják-e az ANT sejtek dorsalis dendritjeire érkező bemeneteket, és ilyen módon

beleszólhatnak-e a mély dendritiken fogadott bemenettel való integrációba, ami végső soron az ANT sejtek kimenetét fogja meghatározni.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A dolgozatban bemutatott munka során összesen 34, a gerincvelő hátsó szarvából származó neuron teljes axon- és dendrithálózatát rekonstruáltuk 3-dimenzióban. Legjobb tudásunk szerint ez az első ilyen részletességgel elvégzett morfometriai analízis ezeken a sejtípusokon. Az I-es és III-as lamina beli sejtek eltérő axonkollaterális megoszlása ezen neuroncsoportok eltérő szerepét feltételezi a gerincvelő szomatoszenzoros feldolgozó hálózatában.

Az eredményeinkben feltárt anatómiai aszimmetria az I-es lamina interneuronjai (IN) esetében magyarázatul szolgálhat bizonyos korábban leírt funkcionális aszimmetriákra, illetve egybecseng a kisugárzó fájdalmat lateromedialis információáramlással magyarázó irodalmi elképzelésekkel. A projekciós neuronok (PN) mélyebb laminákban található axonkollaterálisai hozzájárulhatnak egy, a mélyebb laminákat aktiváló dorsoventralis információáramláshoz. Ez az anatómiai kapcsolat eltérő felszállópályák funkcionális kapcsolatát teremtheti meg.

Az antenna (ANT) sejtek dendritfájának kiterjedése képessé teszi őket a különböző típusú primer afferens bemenetektől (A $\beta$ , A $\delta$  és C) származó modalitások integrálására, valamint WDR neuronként való működésre. Azok az ANT sejtek, melyek axonkollaterálisai a felszínes laminákba (I és II) is eljutnak, kapcsolódhatnak az I-es lamina PN-jaihoz és IN-jaihoz, valamint akár saját dorsalis dendritjeikre érkező szinaptikus bemeneteiket is modulálhatják. Ez az eredményeinkben feltárt útvonal a III-as lamina sejteinek anatómiai lehetőséget ad a nociceptív feldolgozókörökben való részvételre és lehetővé teszi, hogy alacsony küszöbű mechanoreceptorokból származó bemenetet közvetítsenek az I-es lamina sejtjei felé.

## 8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Első körben szeretném a portugál munkacsoport minden tagjának megköszönni a segítséget (i3S, Porto, Portugália), akikre nem is kollaborációs partnerként hivatkoznék, hanem közvetlen kollégákra, csak 3000 km-rel távolabbról segítettek egymás munkáját. Abban az igen kivételes helyzetben lehettem, hogy egy évet el is tölthettem velük Portóban, ami igazán fantasztikus és meghatározó élmény volt számomra. Külön ki kell emelnem Liliana Luz-t, akinek barátsága és útmutatása rengeteg erőt adott a megtett utam során. A PhD disszertációhoz felhasznált publikációk is ebből a munkacsoportból indultak, köszönet Dr. Boris Safronovnak, a munkacsoport vezetőjének, valamint szerzőtársaimnak, hogy hozzájárultak tudásukkal a közlemények elkészültéhez és megengedték ezen eredmények felhasználását.

Köszönöm továbbá témavezetőmnek, Dr. Szücs Péternek, hogy egy olyan háttérrel biztosított munkámhoz, ami lehetőséget adott, hogy több nemzetközi laborban is kipróbáljam magam. Sosem fogom neki elfelejteni, hogy akkor bízott bennem, amikor én a legkevésbé hittem magamban.

Szeretném kifejezni hálám korábbi témavezetőimnek is, Dr. Pór Ágnesnek és Dr. Pál Balázsnak, akiktől rengeteget tanulhattam szakmailag és emberileg is, a tőlük megszerzett tapasztalatok végig kísérték PhD-s éveim alatt.

Köszönöm továbbá a családom támogatását, akik igyekeztek tartani bennem a lelket, amikor szükségem volt arra. Az elmúlt évek során meglévő barátságok mélyültek el, de újak is születtek. Köszönöm mindannyiuknak!

Mindemellett az elmúlt években nem csak ez a munka formálódott, hanem azzal együtt én is rengeteget változtam, amit nem érhettem volna el a munka környezetemben lévők nélkül. Nagyon szerencsésnek tartom magam, hogy rengeteg segítőkész emberrel találkozhattam utam során!



Nyilvántartási szám: DEENK/13/2024.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

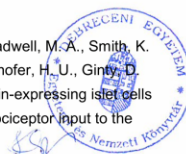
Jelölt: Kókai Éva  
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kókai, É.**, Luz, L. L., Fernandes, E. C., Safronov, B. V., Poisbeau, P., Szűcs, P.: Quantitative spatial analysis reveals that the local axons of lamina I projection neurons and interneurons exhibit distributions that predict distinct roles in spinal sensory processing. *J. Comp. Neurol.* 530 (18), 3270-3287, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cne.25413>  
IF: 2.5
2. Fernandes, E. C., Santos, I. C., **Kókai, É.**, Luz, L. L., Szűcs, P., Safronov, B. V.: Low- and high-threshold primary afferent inputs to spinal lamina III antenna-type neurons. *Pain.* 159 (11), 2214-2222, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001320>  
IF: 6.029

### További közlemények

3. Gutierrez-Mecinas, M., **Kókai, É.**, Polgár, E., Quillet, R., Titterton, H. F., Weir, G. A., Watanabe, M., Todd, A. J.: Antibodies Against the Gastrin-releasing Peptide Precursor Pro-Gastrin-releasing Peptide Reveal Its Expression in the Mouse Spinal Dorsal Horn. *Neuroscience.* 510, 60-71, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.12.023>  
IF: 3.3 (2022)
4. Davis, O. C., Dickie, A. C., Mustapa, M. B., Boyle, K. A., Browne, T. J., Gradwell, M. A., Smith, K. M., Polgár, E., Bell, A. M., **Kókai, É.**, Watanabe, M., Wildner, H., Zeilhofer, H. U., Ginty, D. D., Callister, R. J., Graham, B. A., Todd, A. J., Hughes, D. I.: Calretinin-expressing islet cells are a source of pre- and post-synaptic inhibition of non-peptidergic nociceptor input to the mouse spinal cord. *Sci. Rep.* 13 (1), 1-22, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-023-38605-9>  
IF: 4.6 (2022)





5. Luz, L. L., Lima, S., Fernandes, E. C., **Kókai, É.**, Gömöri, L., Szűcs, P., Safronov, B. V.:  
Contralateral Afferent Input to Lumbar Lamina I Neurons as a Neural Substrate for Mirror-  
Image Pain.  
*J. Neurosci.* 43 (18), 3245-3258, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1897-22.2023>  
IF: 5.3 (2022)
6. **Kókai, É.**, Alsulaiman, W. A. A., Dickie, A. C., Bell, A. M., Goffin, L., Watanabe, M., Gutierrez-  
Mecinas, M., Todd, A. J.: Characterisation of deep dorsal horn projection neurons in the  
spinal cord of the Phox2a::Cre mouse line.  
*Mol Pain.* 18, 1-16, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/17448069221119614>
7. Mészár, Z. M., **Kókai, É.**, Varga, R., Ducza, L., Papp, T., Béres, M., Nagy, M., Szűcs, P., Varga,  
A.: CRISPR/Cas9-Based Mutagenesis of Histone H3.1 in Spinal Dynorphinergic Neurons  
Attenuates Thermal Sensitivity in Mice.  
*Int. J. Mol. Sci.* 23 (6), 3178, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms23063178>  
IF: 5.6
8. Fernandes, E. C., Carlos, F. J., Luz, L. L., **Kókai, É.**, Mészár, Z. M., Szűcs, P., Safronov, B. V.:  
Processing of trigeminocervical nociceptive afferent input by neuronal circuitry in the upper  
cervical lamina I.  
*Pain.* 163 (2), 362-375, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002342>  
IF: 7.4
9. Papp, T., Ferenczi, Z., Szilágyi, B., Petró, M., Varga, A., **Kókai, É.**, Berényi, E., Oláh, G., Halmos,  
G., Szűcs, P., Mészár, Z. M.: Ultrasound Used for Diagnostic Imaging Facilitates Dendritic  
Branching of Developing Neurons in the Mouse Cortex.  
*Front. Neurosci.* 16, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2022.803356>  
IF: 4.3
10. Varga, A., Mészár, Z. M., Sivadó, M., Bácskai, T., Végh, B., **Kókai, É.**, Nagy, I., Szűcs, P.: Spinal  
Excitatory Dynorphinergic Interneurons Contribute to Burn Injury-Induced Nociception  
Mediated by Phosphorylated Histone 3 at Serine 10 in Rodents.  
*Int. J. Mol. Sci.* 22 (5), 1-28, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22052297>  
IF: 6.208
11. Fernandes, E. C., Pechincha, C., Luz, L. L., **Kókai, É.**, Szűcs, P., Safronov, B. V.: Primary  
afferent-driven presynaptic inhibition of C-fiber inputs to spinal lamina I neurons.  
*Prog. Neurobiol.* 188, 1-15, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101786>  
IF: 11.685





12. Luz, L. L., Fernandes, E. C., Sivadó, M., **Kókai, É.**, Szűcs, P., Safronov, B. V.: Monosynaptic convergence of somatic and visceral C-fiber afferents on projection and local circuit neurons in lamina I.  
*Pain*. 156 (10), 2042-2051, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000267>  
IF: 5.557

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 62,479**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):  
8,529**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2024.01.16.

