

**EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS**

---

**A HCN<sub>2</sub> IONCSATORNÁK EXPRESSZIÓJA PATKÁNY  
GERINCVELŐ HÁTSÓ SZARVÁBAN ÉS SZEREPE A  
GYULLADÁSOS FÁJDALOM TRANZMISSZIÓJÁBAN**

**Papp Ildikó**

**Témavezető: Prof. Dr. Antal Miklós**



**DEBRECENI EGYETEM  
IDEGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

---

**DEBRECEN, 2010.**

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>Rövidítések jegyzéke.....</b>	<b>5</b>
<b>1. Bevezetés.....</b>	<b>7</b>
<b>2. Irodalmi áttekintés .....</b>	<b>10</b>
2. 1. A hiperpolarizáció által aktiválódó ionáram ( $I_h$ ) és a HCN ioncsatornák biofizikai jellemzői .....	10
2. 2. A HCN ioncsatornák strukturális felépítése és különböző izoformái .....	14
2. 3. A hiperpolarizáció által kiváltott ionáram ( $I_h$ ) és a HCN ioncsatornák fiziológiai szerepe .....	17
2. 3. 1. A hiperpolarizáció által aktiválódó ionáram szerepe a nyugalmi membránpotenciál beállításában.....	18
2. 3. 2. Az $I_h$ részvétele a dendritikus integráció és a hálózati oszcilláció kialakításában .....	19
2. 3. 3. Az $I_h$ szerepe a neuronális spontán aktivitásban.....	19
2. 3. 4. Az $I_h$ és a szinaptikus jelátvitel kapcsolata.....	21
2. 4. A HCN ioncsatornák expressziója a gerincvelői dúcsejtekben és szerepe a fájdalom transzmissziójában.....	22
<b>3. Anyagok és módszerek .....</b>	<b>23</b>
3. 1. Kísérleti állatok és a szövetmetszetek előkészítése .....	23
3. 2. Magatartás vizsgálat a mechanikai allodynia kimutatására.....	25
3. 3. Immunperoxidáz hisztokémiai vizsgálatok .....	26
3. 4. Preembedding nanogold immunhisztokémiai vizsgálatok .....	27
3. 5. Immunfluoreszcens hisztokémiai vizsgálatok .....	27
3. 6. Elektrofiziológiai vizsgálatok.....	31
3. 7. Immunhisztokémiai vizsgálatok a Freund-adjuvánssal indukált gyulladásos fájdalommodellben .....	32
3. 8. Western blot elemzés.....	34
<b>4. Eredmények .....</b>	<b>36</b>
4. 1. HCN2 immunreaktivitás a gerincvelő hátsó szarvában.....	36
4. 2. A HCN2 immunreaktivitás és a peptiderg, illetve nem-peptiderg primer afferensek kapcsolata.....	37
4. 3. HCN2 fehérjék szubcelluláris megoszlása a peptiderg nociceptív primer afferensek axonterminálisában .....	39
4. 4. A HCN2 ioncsatornák kolokalizációja vezikuláris glutamát transzporterekkel és P-anyaggal .....	41

4. 5. A HCN2-immunreaktív primer afferensek posztszinaptikus kapcsolatai serkentő és gátló gerincvelői interneuronokkal.....	43
4. 6. A HCN ioncsatornák antagonistájának (ZD7288) hatása a C és A $\delta$ primer afferensek és a hátsó szarv I-II. laminájának idegsejtjei között kialakuló szinaptikus jelátvitelre .....	46
4. 7. A mechanikai allodynia kialakulása Freund-adjuváns által kiváltott gyulladáso s fájdalomállapotban .....	49
4. 8. c-Fos fehérje expresszió a patkány gerincvelő felületes hátsó szarvában CFA-val indukált gyulladáso s fájdalomállapotban .....	50
4. 9. A HCN2-csatornafehérje kifejeződéso a lumbális gerincvelő hátsó szarvában Freund-adjuvánssal kiváltott gyulladáso s fájdalomállapotban.....	53
4. 9. 1. A HCN2-immunreaktív terület nagysága a gerincvelő hátsó szarvában Freund-adjuváns által kiváltott gyulladáso s fájdalomállapotban .....	53
4. 9. 2. A HCN2- és SP-immunreaktív axonterminálisok száma, illetve a HCN2 és SP immunreaktivitás kolokalizációja a lumbális gerincvelő felületes hátsó szarvában CFA-val indukált gyulladáso s fájdalomállapotban .....	55
4. 9. 3. A HCN2 fehérje mennyiségének változása a lumbális gerincvelő hátsó szarvában CFA-val kiváltott gyulladáso s fájdalomállapotban .....	59
<b>5. Megbeszélés .....</b>	<b>61</b>
5. 1. A HCN ioncsatornák 2-es izoformájának (HCN2) expressziója a gerincvelő felületes hátsó szarvában végződő peptiderg nociceptív primer afferensek centrális axonvégződésoiben .....	61
5. 2. A HCN ioncsatornák lehetséges szerepe a peptiderg nociceptív primer afferensek gerincvelői axonterminálisaiban .....	62
5. 3. A HCN ioncsatornák 2-es izoformája (HCN2) és a vezikuláris glutamát transzporterek (VGluT) immunreaktivitásának szegregációja a gerincvelő hátsó szarvában .....	64
5. 4. A HCN ioncsatornák 2-es izoformája (HCN2) és a P-anyag (SP) immunreaktivitásának kolokalizációja a gerincvelő felületes hátsó szarvában.....	65
5. 5. A HCN2-immunreaktív axonterminálisok posztszinaptikus kapcsolatai a gerincvelő felületes hátsó szarvában .....	66
5. 6. A HCN2 ioncsatornák által mediált ionáram (I <sub>h</sub> ) hatásai a C /A $\delta$ primer afferensek és a gerincvelői felületes hátsó szarv neuronjai között lévő szinaptikus jelátvitelre .....	67
5. 7. Bilaterális változások a gerincvelő felületes hátsó szarvában teljes Freund-adjuváns (CFA) által kiváltott unilaterális talpgyulladás során.....	69
5. 8. Preszinaptikus HCN2 ioncsatornák a nociceptív primer afferensek centrális axonterminálisaiban gyulladáso s fájdalomban .....	70
<b>6. Összefoglalás .....</b>	<b>73</b>
<b>Summary .....</b>	<b>74</b>
<b>7. Irodalomjegyzék .....</b>	<b>75</b>

<b>8. Saját közlemények jegyzéke .....</b>	<b>84</b>
<b>9. Tárgyszavak .....</b>	<b>86</b>
<b>10. Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>87</b>
<b>11. Függelék.....</b>	<b>88</b>

## Az értekezésben előforduló rövidítések jegyzéke

I <sub>ii</sub> :	a gerincvelői szürkeállomány II-es laminájának belső része
I <sub>io</sub> :	a gerincvelői szürkeállomány II-es laminájának külső része
5-HTR:	szerotoninreceptor
A <sub>1</sub> R:	adenozin A <sub>1</sub> -receptor
AC:	adenilát-cikláz
Adsz:	az antitest antigénjével való kimerítése
CA1:	hippocampus CA1 pyramissejtjei
CaB:	calbindin D28k
cAMP:	ciklikus adenzin-monofoszfát
CFA:	teljes Freund-adjuváns
CGRP:	kalcitonin génhez rendelt peptid
CNBD:	ciklikus nukleotid-kötő domén
DAB:	diaminobenzidin
DK-AH 269:	cilobradine, HCN-csatorna blokkoló
eGFP:	zölden fluoreszkáló fehérje
EPSP:	serkentő posztszinaptikus potenciál
GABA:	gamma-aminovajsav
GABAerg:	gamma-aminovajsavat felszabadító neuronok
GAD65:	glutaminsav-dekarboxiláz 65-ös izoformája
GAP-DH:	gliceraldehid 3-foszfát-dehidrogenáz
GC:	guanilát-cikláz
GluR2:	AMPA-típusú glutamát-receptor 2-es alegysége
G <sub>o/i/s</sub> :	G-fehérjék
GYG:	glicin-tirozin-glicin aminosavszekvencia triplet
H <sub>2</sub> R:	hisztamin-receptor
HCN:	hiperpolarizáció által aktiválódó és ciklikus nukleotid-függő kationcsatorna
HEK 293:	humán embryonális veséből származó 293-as sejtvonal
His:	hisztidin oldallánc
IB4:	izolektin-B4
IEG:	„immediate early genes” géncsalád
I <sub>f</sub> / I <sub>q</sub> :	„funny”/ „queer” ionáram
I <sub>h</sub> :	hiperpolarizáció által aktiválódó ionáram
IM:	a gerincvelői felületes hátsó szarv intermedier régiója
I <sub>Ca(T)</sub> :	T-típusú Ca <sup>2+</sup> -csatornák ionárama
K <sup>+</sup> <sub>(ir)</sub> :	befelé rektifikáló feszültségfüggő K <sup>+</sup> -csatorna
L:	a gerincvelői felületes hátsó szarv laterális régiója
L3-L5:	a gerincvelő lumbális szakaszának 3-5 szegmentumai
LTF:	hosszú távú facilitálás
LTP:	hosszú távú potenciálódás
M:	a gerincvelői felületes hátsó szarv mediális régiója
mGluR:	metabotrop glutamát-receptor
MIRP1:	min-K-kapcsolt fehérje
βR:	adrenerg β-receptor
NK1-R:	neurokinin 1-receptor
NO:	nitrogén-monoxid
MOR:	μ-opioid-receptor
PIP <sub>2</sub> :	foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát

$P_K$ :	$K^+$ -ionokra vonatkozó permeabilitás
$P_{Na}$ :	$Na^+$ -ionokra vonatkozó permeabilitás
PVDF:	polivinilidén-fluorid
Rhiz:	dorzális rhizotomia
S:	transzmembrán szegmentum
S1:	első sacralis gerincvelői szegmentum
SDS:	nátrium-dodecil-szulfát
SF:	ionszelektivitásért felelős szűrőrégió
SP:	P-anyag
sEPSP:	spontán serkentő posztzinaptikus potenciál
$V_{1/2}$ :	fél-aktiválódási feszültség
VGluT1-3:	vezikuláris glutamát transzporter 1-3
ZD7288:	specifikus HCN-csatorna blokkoló

# 1. BEVEZETÉS

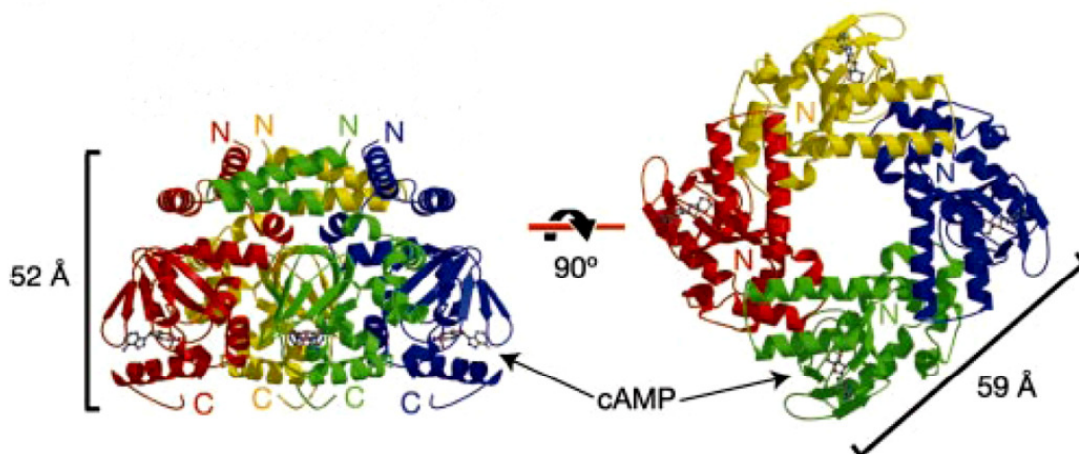
Az idegrendszer összetett működése az idegsejtek belső neuronális tulajdonságai és szinaptikus kapcsolatai között lévő összehangolt kommunikáción keresztül valósul meg. Az idegsejtek intrinsic elektrofiziológiai tulajdonságait az általuk expresszált membránhoz kötött feszültség- és ligandfüggő ioncsatornák fajtája, mennyisége és eloszlása határozza meg. Az ioncsatornák konduktanciáját a csatornák típusától függően a sejtmembrán membránpotenciálja, vagy különböző kémiai anyagok (ligandok) szabályozzák. Az ioncsatornákon keresztül folyó ionáramlás irányát és nagyságát az adott ionra vonatkozó elektrokémiai grádiens határozza meg.

A feszültségfüggő kationcsatornák többsége, pl. különböző  $\text{Na}^+$ - és  $\text{K}^+$ -csatornák, membránpolarizáció esetén aktiválódik, és az általuk közvetített ionáramok a membránpotenciál kialakulásához járulnak hozzá. Egy csoportjuk viszont meglepő módon, a többi csatornától eltérően, a nyugalmi membránpotenciáltól negatívabb potenciálértékeknél, vagyis hiperpolarizáció során aktiválódik, és a sejtbe befelé tartó kationáramával lassan depolarizálja a membránt. Ezt a szokatlan tulajdonságokkal rendelkező befelé irányuló (inward) ionáramot először az 1970-es években fedezték fel egymástól függetlenül a kétéltűek fotoreceptoráiban és az emlősök szívében (Bader és mtsai., 1979; Brown és mtsai., 1979). A fotoreceptorokban regisztrált ionáramot hiperpolarizáció által aktiválódó ( $I_h$ ), míg az emlősszív sinuscsomójában és Purkinje-rostjaiban mért áramot „funny” (furcsa) áramnak ( $I_f$ ) nevezték el (DiFrancesco, 1981). Halliwell és Adams 1982-ben bizonyították először ezen ionáram meglétét a központi idegrendszerben, a hippocampus pyramissejtjeiben, és furcsa jellemzői, illetve ismeretlen feladata miatt a „queer” (különös) áram ( $I_q$ ) nevet kapta. Később a központi és perifériás idegrendszer számos területén leírták, és megkülönböztetve a szívben, korábban felfedezett ionáramtól ( $I_f$ ), a neurobiológiában hiperpolarizáció által aktiválódó ionáramnak ( $I_h$ ) nevezik (Hille, 1992).

A hiperpolarizáció során aktiválódó ionáramot mediáló ioncsatornák másik érdekes tulajdonsága, hogy ciklikus nukleotidok, elsősorban cAMP közvetlen kötődésével a csatornák steady-state aktivációja pozitívabb membránpotenciál-értékek irányába mozdul, aminek köszönhetően kisebb mértékű hiperpolarizáció is aktiválja a csatornákat, és több csatorna kerül aktivált állapotba, tehát összességében gyorsul az aktivációs kinetika. Az ioncsatornákat ezért különleges, jellemző ismertetőjegyeik

alapján **hiperpolarizáció** által aktiválódó és **ciklikus nukleotid-függő kationcsatornáknak** nevezték el (**HCN**).

A HCN csatornafehérjék génjeinek klónozásával négy különböző izoformát (HCN1-4) fedeztek fel, amelyek kisebb-nagyobb mértékben különböznek egymástól aktivációs kinetikájukat és cAMP-re mutatott érzékenységüket tekintve. A funkcionális HCN-csatornák négy alegységből felépülő tetramer ioncsatornákat formálnak (1. ábra).



1. ábra. A HCN2 ioncsatornák négy alegységből álló tetramer szerkezetének háromdimenziós szalagmodellje. A piramis alakú tetramer ioncsatorna C terminálisai a piramis alapjánál, N terminálisai a csúcsánál helyezkednek el. Az ioncsatorna szélessége 59 Å, magassága 52 Å. A bal oldali ábra oldalnézetből, a jobb oldali felülnézetből mutatja a tetramer ioncsatornát. Az egyes alegységek különböző színben vannak feltüntetve. (Zagotta és mtsai., 2003)

A HCN-csatornák különböző izoformáinak eloszlását először a szívben vizsgálták, később azonban alaposan feltérképezték a központi és perifériás idegrendszer számos területén is, elsősorban patkányokat és egereket használva kísérleti állatként. Patkány gerincvelői dúcsejtjeiben például, először a hiperpolarizáció által aktiválódó ionáramot ( $I_h$ ) mutatták ki, majd később a HCN1-, 2- és 3-as típusú izoforma mRNS-ét és fehérjéjét is azonosították.

A gerincvelői dúcokban elhelyezkedő pszeudounipoláris érzőneuronok mechanikai, hő- és kémiai ingerek érzékelésére specializálódtak. Az ingerek hatására, specifikus receptorok aktiválódásán keresztül a neuronok perifériás axonvégződésai depolarizálódnak. Ha a depolarizáció elég erős, akkor az axonvégződéshez legközelebb elhelyezkedő első Ranvier-befűződésnél akciós potenciál generálódik, ami a perifériás és centrális axon mentén a gerincvelő hátsó szarvába továbbítódik. Bár a HCN

ioncsatornák expressziós mintázata és szerepe a gerincvelői dűcsejtsek sejtestjeiben viszonylag jól ismert, nem tudjuk, hogy a HCN fehérjék transzportálódnak-e a primer afferensek perifériás vagy centrális nyúlványaiba, és megjelennek-e a perifériás vagy centrális axonvégzódésekben. Az sem ismeretes, hogy ha transzportálódnak a HCN ioncsatornák, akkor milyen típusú primer afferensek szállítják őket, és részt vesznek-e a szomatoszenzoros érzékelés periférián, vagy gerincvelőben zajló folyamataiban.

Mivel a csatornafehérjék kifejeződése a primer afferensek gerincvelői centrális terminálisaiban egyáltalán nem ismert, azt sem tudjuk, hogy az  $I_h$  ionáramok szerepet játszhatnak-e a primer afferens és a gerincvelői szekunder érzőneuron közötti szinaptikus transzmisszió szabályozásában. Nem vizsgálták még azt sem, hogyan változik a HCN ioncsatornák kifejeződése az elsődleges érzőneuronokban krónikus gyulladással járó fájdalom esetén. Kutatásaink ebből a szempontból úttörő jellegűnek bizonyultak.

Kutatásaink során a következő célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

1. A patkányok gerincvelői dűcsejtjeiben expresszáldó HCN ioncsatornák izoformáinak kimutatása a gerincvelő hátsó szarvában végződő elsődleges érző neuronok centrális axonterminálisaiban.
2. A HCN2 ioncsatorna fehérjéket expresszáldó nociceptív primer afferensek neurokémiai jellemzőinek feltárása, és lehetséges posztzinaptikus kapcsolatainak feltérképezése a rágcsálók gerincvelőjének felületen hátsó szarvában.
3. A HCN2 ioncsatornák funkcionális jelentőségének és a nociceptív ingerületátvitelben betöltött szerepének elektrofiziológiai vizsgálata az ioncsatornákat expresszáldó nociceptív primer afferensek axonterminálisaiban.
4. A HCN2 fehérjék expressziójában bekövetkező változások tanulmányozása Freund-adjuváns által indukált krónikus gyulladással járó fájdalommodellben.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2. 1. A hiperpolarizáció által aktiválódó ionáram ( $I_h$ ) és a HCN ioncsatornák biofizikai jellemzői

Először 34 évvel ezelőtt a szív sinuscsomójának sejtjeiben regisztrálták a hiperpolarizáció által aktiválódó ionáramot, mint egy lassan kialakuló „inward” ionáramot, ami a nyugalmi membránpotenciálnál negatívabb potenciálértékeknél, vagyis hiperpolarizáció esetén aktiválódott (Noma és Irisawa, 1976). Azóta a központi és perifériás idegrendszer számos területén is azonosították, és elektrofiziológiai vizsgálatokkal több szokatlan tulajdonságát leírták.

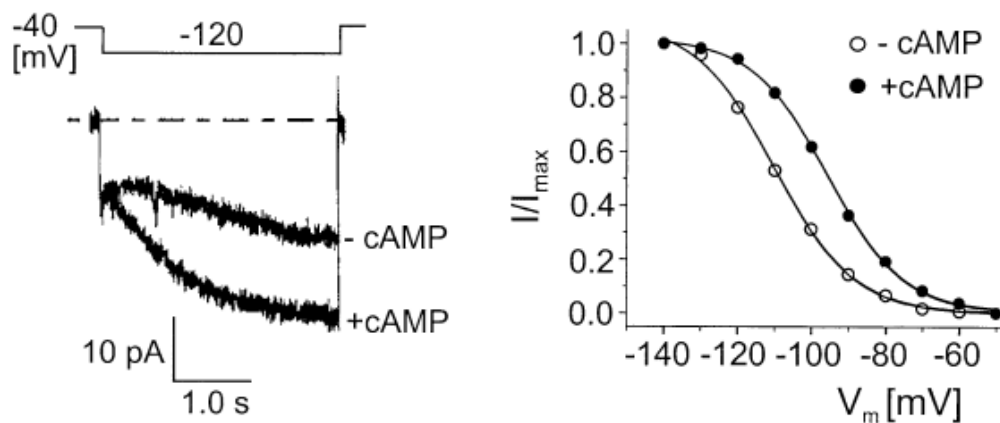
A HCN ioncsatornák által közvetített hiperpolarizáció során aktiválódó ionáram egy olyan kevert,  $Na^+/K^+$  kationáram, amely  $-40 - -50$  mV-nál negatívabb membránpotenciál-értékeknél aktiválódik, és a csatornák maximális konduktanciájukat  $-120 - -140$  mV-nál éri el. Az ionáram aktivációja általában lassan, késleltetve indul, exponenciális kinetikát mutat, és a különféle sejtípusokban különböző idő alatt éri el a dinamikus egyensúlyi állapotot. A hiperpolarizáció által indukálódó ionáram steady-state aktivációjának fél-aktivációs feszültségértéke ( $V_{1/2}$ ) sejtípustól függően  $-60 - -90$  mV között változik (Pape, 1996; Robinson és Siegelbaum, 2003).

A HCN-csatornák  $Na^+$ - és  $K^+$ -ionra egyaránt permeábilisak és a csatornák nátrium- és káliumionra mutatott permeabilitási aránya  $P_{Na}/P_K$ ,  $0,2 - 0,4$  között mozog (Pape, 1996). Nyugalmi membránpotenciálnál az ioncsatornák aktivációja olyan inward áramot eredményez, amely elsősorban  $Na^+$ -beáramlást idéz elő, és ezáltal depolarizálja a membránt az akciós potenciál küszöbértéke felé. A HCN ioncsatornák konduktanciáját az extracelluláris  $K^+$ -koncentráció változása nagymértékben befolyásolja, azáltal, hogy a  $K^+$ -szint fiziológiás érték alá süllyedése a hiperpolarizáció által aktiválódó ionáram erősségének csökkenését vonja maga után (Robinson és Siegelbaum, 2003). Elektrofiziológiai és fluoreszcens  $Ca^{2+}$ -imaging módszerekkel HEK293 sejtekben és gerincvelői dúcsejtekben kimutatták, hogy az ioncsatornák  $Ca^{2+}$ -ionra is permeábilisak, és az inward kationáram csekély mértékben ( $0,6\%$ )  $Ca^{2+}$ -ionokat is tartalmaz, aminek biológiai jelentősége elhanyagolható (Yu és mtsai., 2004).

A HCN csatornákat  $1-2$  mM koncentrációban alkalmazott  $Cs^+$ -ionok blokkolják, bár nem szelektíven. Számos szerves vegyületet írtak le, amelyek a bradycardiás gyógyszerekhez tartoznak, és specifikusan gátolják az ioncsatornák működését, például

az ivabradin (S-16257), a DK-AH 269 és a kutatásokban leggyakrabban használt ZD7288 (Bois és mtsai, 1996; Gasparini és DiFrancesco, 1997; Shin és mtsai, 2001).

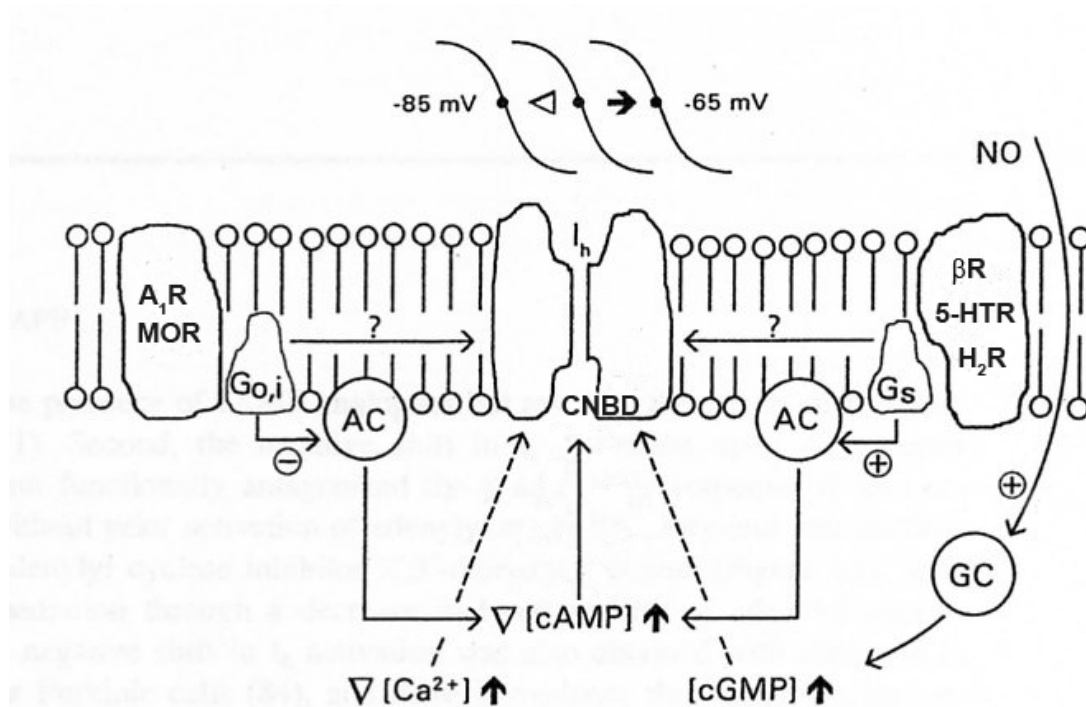
Az ioncsatornák egyik legjellemzőbb tulajdonsága, hogy az intracelluláris ciklikus nukleotidok közvetlenül szabályozzák aktivitásukat. A cAMP kötődésével a HCN-csatornák steady-state aktivációja 10-15 mV-tal pozitívabb membránpotenciálértékek felé tolódik el, aminek következtében kisebb mértékű hiperpolarizáció is aktiválja az ioncsatornákat és adott membránpotenciálon több csatorna kerül aktivált állapotba. Így nagyobb lesz az adott membránpotenciálon mérhető azonnali áramkomponens, tehát mindent egybevetve gyorsul az aktivációs kinetika (Biel és mtsai, 2002) (2. ábra).



**2. ábra.** A HCN ioncsatornák cAMP-vel történő modulációja. A bal oldali ábra az ioncsatornák inside-out patch-clamp technikával mért ionáramgörbéit, a jobb oldali pedig teljes-sejtes konfigurációjú patch-clamp módszerrel mért aktivációs görbéit mutatja cAMP hiányában és jelenlétében. Az ábrákon látható, hogy a cAMP növeli az ionáram ( $I_h$ ) erősségét, gyorsítja az aktivációkinetikát, és 15 mV-tal pozitívabb potenciálok felé tolja el az ioncsatornák aktivációs görbéjét. (Biel és mtsai., 2002)

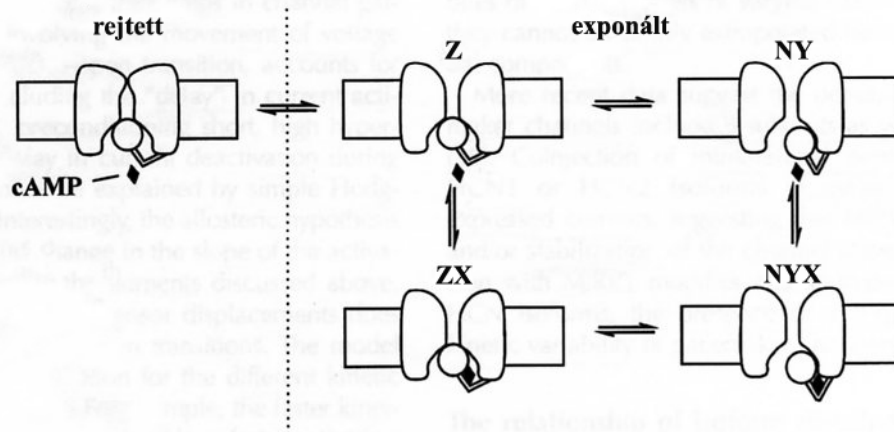
Azok a G-protein kapcsolt receptorok, amelyek az adenilát-cikláz rendszeren keresztül hatva növelik ( $\beta$ -adrenerg, szerotonin-receptor), illetve csökkentik (adenozin  $A_1$ - és  $\mu$ -opioid-receptor) az intracelluláris cAMP szintjét, a csatornák aktivitását felerősítik vagy gyengítik, és az aktivációs görbét pozitív vagy negatív irányba tolják el (Pape, 1996; Biel és mtsai, 2002). Bizonyították, hogy a cGMP is növeli az ioncsatornák aktivációját, csak jóval kisebb mértékben, mint a cAMP (Ludwig és mtsai, 1998). Az agyban és a szívben végzett vizsgálatok azt mutatták ki, hogy a nitrogén-monoxid is befolyásolhatja a HCN csatornák aktivitását, mivel a guanilát-cikláz

serkentésén keresztül növeli a cGMP szintjét (Pape és Mager, 1992; Musialek és mtsai, 1997) (3. ábra).



**3. ábra.** A hiperpolarizáció által aktiválódó ionáram ( $I_h$ ) szabályozásának különböző útvonalai. Az adenilát-ciklázhoz pozitívan ( $\beta$ -adrenerg, szerotonin, és hisztamin  $H_2$  receptor) vagy negatívan kapcsolt (adenozin  $A_1$ ,  $\mu$ -opioid receptor) receptorok aktivációja az intracelluláris cAMP-szint növelésén vagy csökkentésén keresztül az  $I_h$  aktivációs görbéjét pozitívabb vagy negatívabb feszültségek felé mozdítja el. A cAMP közvetlenül kötődve a CNBD-hez, allostérikusan modulálja a HCN ioncsatornákat. A nitrogén-monoxid (NO) is szabályozhatja az ioncsatornák aktivitását a guanilát-cikláz (GC) aktiválása és a cGMP-szint, illetve a cytoplasmaticus  $Ca^{2+}$ -koncentráció emelkedése révén (szaggatott vonal). (H. C. Pape, 1996, módosítva)

Valószínű, hogy a cAMP közvetlen módon, a csatornafehérjék intracelluláris C terminálisán lévő ciklikus nukleotid-kötő doménhez (CNBD) kötődve hat a kapuzási mechanizmusra, amit az allostérikus cAMP-függő kapuzási modellel magyaráznak. E modell szerint, a cAMP kötődése az ioncsatornák ciklikus nukleotid-kötő régiójához olyan konformáció változást idéz elő, ami elősegíti a csatornák kinyílását (DiFrancesco és Tortora, 1991; DiFrancesco, 1999; Accili és mtsai, 2002) (4. ábra). Bár néhány leírás felveti annak a lehetőségét is, hogy a cAMP foszforilációs útvonalakon keresztül szabályozza az ioncsatornák aktivitását (Yu és mtsai, 1993; Vargas és Lucero, 2002), de ezt közvetlen bizonyítékok nem támasztják alá.



**4. ábra. A HCN ioncsatornák cAMP-függő allosztérikus kapuzási modellje. Az ioncsatornák „rejtett” állapotból „exponált” állapotba kerülését feszültségfüggő kapuzási mechanizmus szabályozza. Az ioncsatornák teljes kapuzásához ezen kívül egy másodlagos konformációváltozás is szükséges, amely megszünteti az ioncsatornák C terminálisához kapcsolódó gátló mechanizmust, és ezáltal a csatornákat nyitott állapotba juttatja. A cAMP-függő allosztérikus kapuzási modell szerint a cAMP hozzákötődése a HCN ioncsatornához olyan konformációváltozást idéz elő, amely felszabadítja a C terminálist a gátlás alól, és elősegíti a csatorna kinyílását. (Accili és mtsai., 2002)**

A HCN ioncsatornák feszültségfüggő kapuzását, más ioncsatornákhöz hasonlóan, a membrán foszfoinozitoljai, elsősorban a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát (PIP<sub>2</sub>) allosztérikusan szabályozzák. Ezen membránlipidek allosztérikus ligandként működve hatnak, és a HCN-csatornák aktivációs görbéjét 20 mV-tal pozitívabb potenciálok felé tolják el, a ciklikus nukleotidok hatásától függetlenül (Zolles és mtsai, 2006). Bár a PIP<sub>2</sub> reguláló hatásának molekuláris mechanizmusa még nem ismert, valószínű, hogy a foszfatidil-inozitolok negatív töltésű csoportjai és a HCN-csatornafehérjék közötti elektrosztatikus kölcsönhatások felelősek az ioncsatornák aktiválásáért, hasonlóan más feszültségfüggő ioncsatornák (K<sup>+</sup><sub>(ir)</sub>) kapuzásának modulálásához (Huang és mtsai, 1998, Oliver és mtsai, 2004). A HCN ioncsatornák PIP<sub>2</sub> által mediált szabályozásának élettani jelentősége a neuronális hálózatok megfelelő működésében nyilvánulhat meg, ugyanis a foszfolipidek enzimatis lebontása csökkenti az ioncsatornák aktivációját, és lassítja a neuronok tüzelési frekvenciáját. Egyrészt a PIP<sub>2</sub> eltérő mennyisége és regionális eloszlása, másrészt a HCN-csatornák különböző alegység-összetétele magyarázhatja a HCN ioncsatornák fél-aktiválódási feszültségértékeinek variabilitását, például különböző fejlődési stádiumokban vagy különböző szívizomsejtekben (Robinson és mtsai, 1997; Qu és mtsai, 2001).

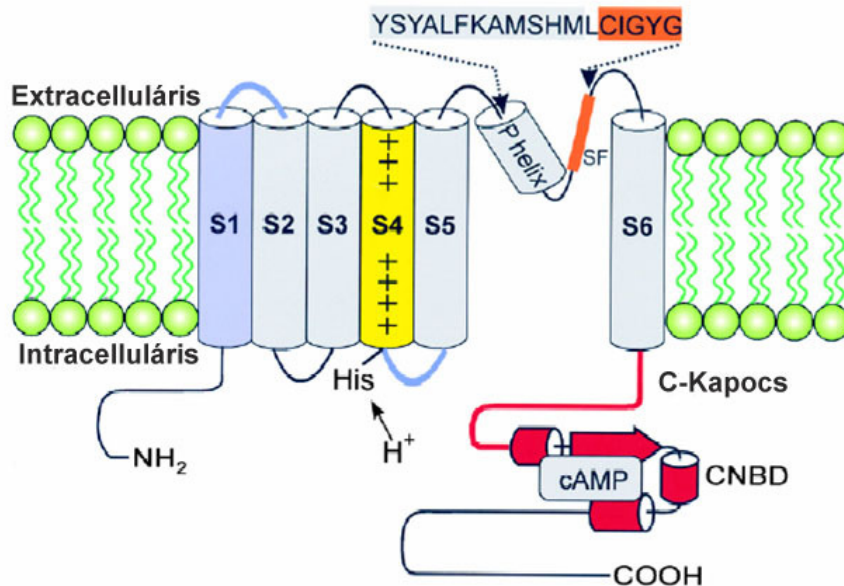
## 2.2. A HCN ioncsatornák strukturális felépítése és különböző izoformái

A hiperpolarizáció által aktiválódó ionáram ( $I_h$ ) felfedezéséhez képest viszonylag későn, a '90-es évek végén sikerült klónozni az ionáramot mediáló ioncsatornákat, amelyeket ma hiperpolarizáció által aktiválódó ciklikus nukleotid-függő (HCN) ioncsatornaként ismerünk. Különböző molekuláris biológiai módszerekkel négy HCN gént, és az azokról átíródó négy fehérjét azonosítottak az emlősökben. Az izoformák aminosavszekvenciája alapján azt is kimutatták, hogy a feszültségfüggő  $K^+$ -csatornák szupercsaládjába tartoznak (Ludwig és mtsai, 1998; Santoro és mtsai, 1997; Santoro és mtsai, 1998). A négyféle izoforma (HCN1-4) nagyfokú hasonlóságot mutat transzmembrán régióját és ciklikus nukleotid-kötő doménjét tekintve, amelyek 80-90%-ban azonosak, viszont a citoplazmatikus amino- (N) és karboxil- (C) terminálisuk jelentősen eltér (Santoro és Tibbs, 1999; Kaupp és Seifert, 2001; Biel és mtsai, 2002).

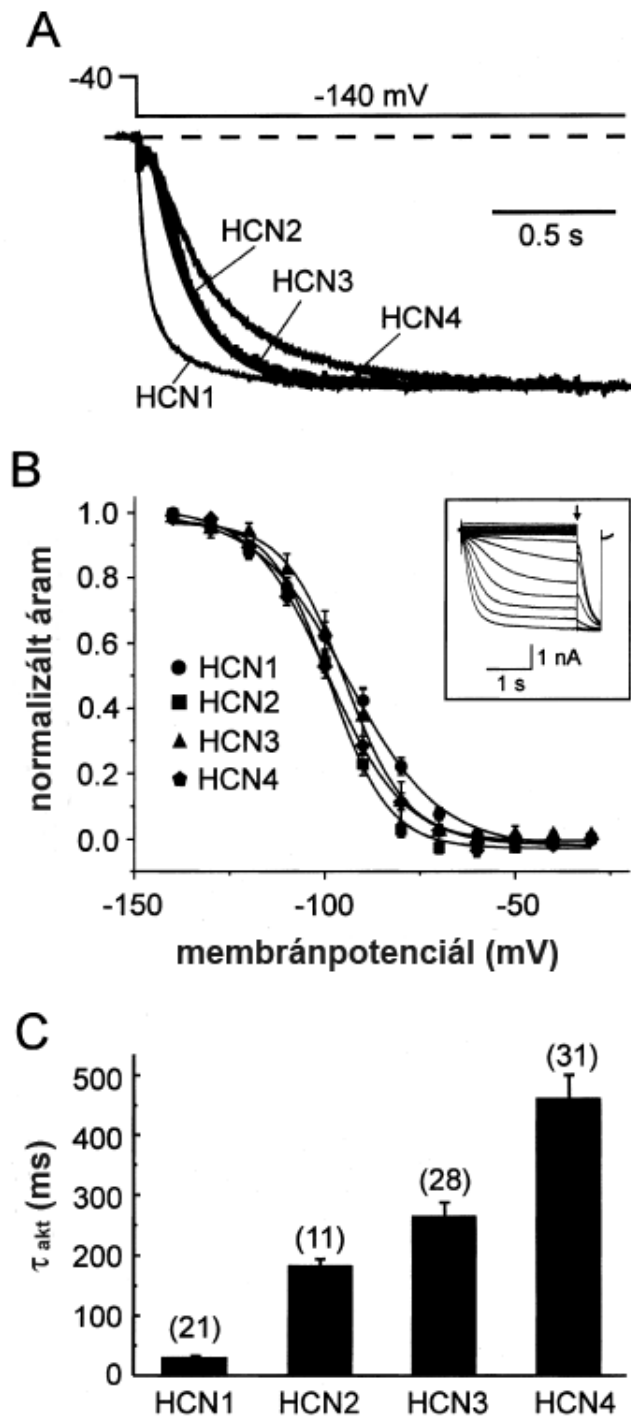
A HCN fehérjék, az egyéb feszültségfüggő  $K^+$  és a ciklikusnukleotid-függő ioncsatornákhöz hasonlóan, négy alegységből álló tetramer szerkezetű ioncsatornákat alkotnak. Az egyes alegységek hat transzmembrán szegmentumból (S1-S6), és a C terminálison lévő, 120 aminosavból felépülő ciklikus nukleotid-kötő doménből (CNBD) állnak, ami a C-linker szakaszon keresztül kötődik az S6-os szegmentumhoz. A pozitív töltésű oldalláncokat tartalmazó S4 szegmentum a feszültségérzékelő része az alegységnek, ami megfelel a feszültségfüggő  $K^+$ -csatornák feszültségérzékelő szegmentumának. Az S5-S6 szegmentum között helyezkedik el a pórus régió, ami egy helikális szakaszból (P hélix) és egy ionszelektivitásért felelős szűrőrészből (SF) áll, ami a  $K^+$ -ra szelektív ioncsatornák jellemző GYG aminosav szekvenciáját tartalmazza. Az ioncsatorna karboxil- (C) és amino- (N) terminálisa is intracelluláris elhelyezkedésű, és a pH érzékenységet az S4 szegmentumhoz kötődő hisztidin oldallánc adja (Biel és mtsai, 2002) (5. ábra).

Elektrofiziológiai vizsgálatokban kimutatták, hogy a különböző fehérje izoformából felépülő (HCN1-4) ioncsatornák aktivációs kinetikájukat tekintve eltérnek egymástól. Az egyes HCN izoformákat expresszáló HEK293 sejtek teljes sejt konfigurációjú patch-clamp mérései azt mutatják, hogy mindegyik izoforma  $-50 - -60$  mV-os potenciálértékeken kezd aktiválódni, és steady-state aktivációja  $-140$  mV körül éri el maximális értékét (6. ábra A, B). A különböző ioncsatorna-típusok aktivációs görbéjének meredeksége és az a feszültségérték, amelyenél a csatornák fele aktiválódik ( $V_{1/2}$ ) kismértékben tér el egymástól; az izoformák aktivációs kinetikája viszont

szignifikáns különbséget mutat. Az izoformák közül a HCN1 aktiválódik leggyorsabban ( $\tau = 30$  ms), ezt követi a HCN2, a HCN3 és végül a HCN4 izoforma egyre növekvő időállandóval ( $\tau = 184, 265$  és  $461$  ms) (Moosmang és mtsai, 2001) (6. ábra C).



5. ábra. A HCN ioncsatorna alegységének molekuláris modellje. Az ioncsatorna két funkcionális egységből áll: a hat transzmembrán szegmentumból (S1-S6) felépülő transzmembrán doménből, amelynek S1 szegmentumához kötődik a csatorna N terminálisa, és az S5-S6 szegmentum között pórusformáló szakaszt alakít ki, illetve a C-kapcsolórészt és a ciklikus nukleotid-kötő domént (CNBD) tartalmazó modulót, C terminális régióból. A csatorna feszültségérzékelő része a pozitív töltésű aminosav-oldalláncokat tartalmazó S4 szegmentum, amelynek intracelluláris, az S5 szegmentummal összekötő kapocsrégiójánál található hisztidin oldallánc határozza meg a csatorna pH szenzitivitását. A HCN alegységek pórusrégióját egy helikális szakasz (P hélix) és az ionszelektivitásért felelős (SF) aminosav-szekvencia alakítja ki, amely a glicin-tirozín-glicin (GYG) triplettból épül fel. (Biel és mtsai., 2002)



6. ábra. A HCN1-4 izoformák elektrofiziológiai tulajdonságai teljes-sejtes konfigurációjú patch-clamp technikával. (A) A HCN1-4 izoformákat expresszáló sejtek ionáramgörbéi -40 mV-os tartópotenciálról -140 mV-os potenciálértékig fokozatosan növekvő, 3 s hosszúságú feszültségimpulzusoknál. (B) A HCN1-4 ioncsatorna izoformák aktivációs görbéi, amelyeket -140 – -40 mV-os feszültségtartományon belül mértek 10 mV-os potenciálemelkedéssel 200 ms (HCN1), 2.5 s (HCN2 és 3), és 10 s (HCN4) hosszúságú impulzusoknál. Az egyes potenciálértékeken mért farokáramokat a -140 mV-on mért értékhez normalizálták, és a megfelelő potenciálok függvényében ábrázolták. (C) Az oszlopdiagramok a HCN1-4 izoformák aktivációs időállandóját ( $\tau_{akt}$ ) mutatják, a zárójelben lévő számok a kísérletek számát jelzik. (Moosmang és mtsai., 2001)

A négyféle izoforma a cAMP moduláló működésének hatékonyságát tekintve is különbözik egymástól. A HCN1 aktivitására kevésbé hat a cAMP, mert steady-state aktivációját csak 2-6 mV-tal tolja el, míg a HCN2 és a HCN4 izoformák egyensúlyi aktivációját 12-23 mV-tal pozitívabb membránpotenciálok irányába képes elmozdítani (Ishii és mtsai, 1999; Ludwig és mtsai, 1998; Moroni és mtsai, 2000; Accili és mtsai, 2002).

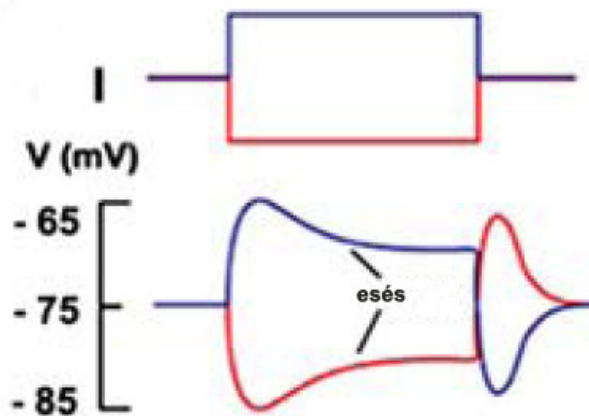
A szervezet különböző sejtjeiben mért, természetesen előforduló hiperpolarizáció által kiváltott ionáramok ( $I_h$ ) és a HEK293 sejttényészetekben expresszáldott HCN izoformák elektrofiziológiai tulajdonságai némileg eltérnek egymástól, ami valószínűleg azzal magyarázható, hogy a szervezetben kifejeződő ioncsatornák nem, vagy nem csak homomerek formájában expresszáldódnak, hanem a különféle izoformák heterotetramereket alkotnak. Ezt bizonyítják azok a molekuláris biológiai és elektrofiziológiai vizsgálatok, amelyekben a HCN1-HCN2 izoformákból álló ioncsatornák aktivációs kinetikáját tanulmányozták, és azt találták, hogy a heteromer csatornák kinetikája a két izoforma által alkotott homomer csatornák paraméterei közötti értékeket mutat (Chen és mtsai, 2001; Ulens és Tytgat, 2001; Xue és mtsai, 2002; Proenza és mtsai, 2002). Újabb vizsgálatok szerint a HCN ioncsatornákhöz kiegészítő alegységek, ún.  $\beta$ -alegységek kapcsolódnak, amelyek tovább módosítják a csatornák kinetikáját. Ilyen alegység a min-K-kapcsolt fehérje (MIRP1), amely a HCN1, illetve HCN2 izoformákkal együtt expresszáldva növeli az  $I_h$  nagyságát, és gyorsítja aktiváció kinetikáját (Yu és mtsai, 2001).

### **2. 3. A hiperpolarizáció által kiváltott ionáram ( $I_h$ ) és a HCN ioncsatornák fiziológiai szerepe**

A hiperpolarizáció által aktiválódó ionáramot számos állatfaj különféle sejttypusaiban leírták, a szív- és simaizomsejtektől kezdve, a gerinctelen állatok motoneuronjain, illetve az alacsonyabb rendű gerincesek fotoreceptorjain és szimpatikus neuronjain keresztül, az emlősök különböző agyrégióinak és gerincvelői dúcainak sejtjeivel bezáróan (DiFrancesco, 1986, 1993; Siegenbeek, 1991; Kiehn és Harris-Warrick, 1992; Bader és Bertrand, 1984; Tokimasa és Akasu, 1990; Santoro és mtsai, 2000, Chaplan és mtsai, 2003; Tu és mtsai, 2004). Széleskörű elterjedésének megfelelően, a HCN-csatornák által generált  $I_h$  fontos szerepet játszik számos meghatározó sejtélettani folyamat szabályozásában.

### 2. 3. 1. A hiperpolarizáció által aktiválódó ionáram szerepe a nyugalmi membránpotenciál beállításában

Az idegsejtek nyugalmi membránpotenciálja elsősorban sejttípustól függően változatos értékeket mutat, de általában abban a feszültségtartományban van (-50 – -80 mV), amelyben a HCN-csatornák is aktiválódnak. Ezen potenciálértékek mellett az ioncsatornák 10-15%-a aktív, és az általuk indukált hiperpolarizáció során aktiválódó ionáram kb. 30%-át teszi ki a nyugalmi potenciál teljes konduktanciájának. A HCN-csatornák más ioncsatornákkal, elsősorban  $K^+$ -csatornákkal együttműködve állítják be a membránpotenciál nyugalmi értékét, ellensúlyozva azok konduktanciáját. Ha a membránpotenciál nő, vagyis hiperpolarizálódik a sejt, akkor az  $I_h$  aktiválódásával a membránpotenciál depolarizálódva visszaesik a nyugalmi szintre, sőt azon túl is lép és utódepolarizációt mutat. Ellenkező esetben, ha a membránpotenciál csökken, vagyis depolarizálódik a sejt, akkor az  $I_h$  deaktiválódik, és a membránfeszültség más ionáramok hatására visszatér a nyugalmi értékre, és a depolarizáló hatás megszűnésekor utóhiperpolarizáció is kialakul (7. ábra). A hiperpolarizáció által kiváltott ionáram tehát stabilizálja a neuronok nyugalmi potenciálját és depolarizáló hatása révén, megakadályozza az akciós potenciált követő repolarizáció során a  $K^+$ -csatornák aktivitásából, illetve az ionpumpák működéséből származó elektrogén hiperpolarizációt (Pape, 1996).



7. ábra. A hiperpolarizáció által aktiválódó ionáram ( $I_h$ ) szerepe a nyugalmi membránpotenciál stabilizálásában. Hiperpolarizáló (piros) vagy depolarizáló (kék) áramimpulzusok hatására az  $I_h$  aktiválódásával (piros) vagy deaktiválódásával (kék) a membránpotenciál a nyugalmi érték felé közelít. A hiperpolarizáló áramimpulzus végén utódepolarizáció (piros), a depolarizáló impulzust követően utóhiperpolarizáció (kék) alakul ki, jelezve az  $I_h$  aktivációját, illetve deaktivációját az adott áramimpulzusok során. (Robinson és Siegelbaum, 2003)

### **2. 3. 2. Az $I_h$ részvétele a dendritikus integráció és a hálózati oszcilláció kialakításában**

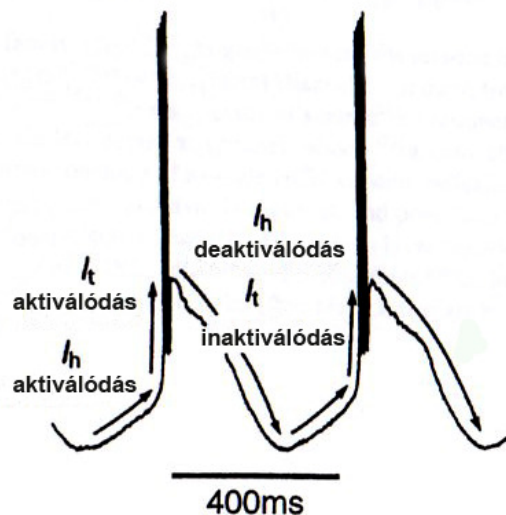
Erőteljes HCN1 fehérjeexpressziót mutattak ki a hippocampus CA1, és az agykéreg 5. rétegében lévő pyramissejtek dendritjeiben. A sejteken végzett patch-clamp mérések azt bizonyítják, hogy a dendritekben expresszálandó  $I_h$  denzitása fokozatosan növekszik a sejttesttől való távolság függvényében (Magee, 1998; Stuart és Spruston, 1998). A dendritikus hiperpolarizáció által kiváltott ionáram jelentősége valószínűleg abban van, hogy a serkentő szinaptikus bemenetekre kialakuló feszültségválaszok, vagyis a serkentő posztszinaptikus potenciálok (EPSP) térbeli különbségeit kiegyenlíti, és a sejttesttől disztálisan és proximálisan lévő EPSP-k dinamikáját normalizálja (Nicoll és mtsai, 1993; Magee, 1999; Williams és Stuart, 2000). A disztális dendritekben jelenlévő  $I_h$  megváltoztatja a membrán lokális fizikai paramétereit, növeli a nyugalmi konduktanciát, csökkenti a membrán idő- és térkonstansát, és ezáltal hat a posztszinaptikus potenciálok dinamikájára (Magee, 1999).

A hippocampus és az agykéreg neuronjaiban expresszálandó HCN-csatornák a passzív membránparaméterek szabályozásán kívül a membránpotenciál-oszcillációk kialakításában is részt vesznek. Számos agyterület mutat ideghálózati oszcillációt, amelyek közül a hippocampusban leírt, 5 Hz-es frekvenciánál megjelenő theta hullám a legismertebb. Ez az oszcilláció akkor alakul ki a hippocampus CA1 pyramissejtjeiben, amikor a kísérleti állat egy új környezetet fedez fel. Valószínű, hogy a pyramissejtek membránpotenciál-oszcillációinak hátterében az  $I_h$  áll, mert az ionáram szelektív antagonistájának (ZD7288) alkalmazásával a membránpotenciál oszcillációja is megszűnik (Buzsáki, 2002; Ulrich, 2002). A pyramissejtek dendritjeiben expresszálandó HCN ioncsatornák tehát a serkentő posztszinaptikus potenciálok dendro-szomatikus integrációjában játszanak szerepet, ezenkívül az ideghálózati oszcilláció kialakításában is részt vesznek.

### **2. 3. 3. Az $I_h$ szerepe a neuronális spontán aktivitásban**

A HCN ioncsatornák nemcsak a szív ritmuskeltő aktivitásában vesznek részt, hanem a neuronális automáciában is fontos szerepet játszanak a központi idegrendszer spontán aktivitást mutató idegsejtjeiben. Az ioncsatornák által közvetített  $I_h$  különféle módon szerepelhet a spontán aktivitás kialakításában és fenntartásában a különböző neuronokban. A thalamocorticalis kapcsoló neuronokban, amelyek 0,5 – 4 Hz

frekvenciájú akciós potenciál-sorozatból álló ritmikus aktivitást mutatnak, az  $I_h$  primer pacemaker funkciót tölt be. A thalamocorticalis relé neuronok tüzelési mintázatát a T-típusú  $Ca^{2+}$ -csatornák és a HCN-csatornák együttesen alakítják ki. Az akciós potenciált követő utóhiperpolarizáció során a HCN-csatornák aktiválódnak és lassú pacemaker depolarizációt generálnak, ami a T-típusú  $Ca^{2+}$ -csatornák aktiválódásán keresztül végül akcióspotenciál-tüzelést vált ki. Az akciós potenciál alatt és azt követően a HCN-csatornák deaktiválódnak, a  $Ca^{2+}$ -csatornák pedig inaktiválódnak, így a membrán repolarizálódik, majd az utóhiperpolarizáció hatására a HCN-csatornák újra aktív állapotba kerülnek, és a ciklus kezdődik előlről (McCormick és Pape, 1990; Robinson és Siegelbaum, 2003) (8. ábra).



**8. ábra.** Az  $I_h$  pacemaker működése a thalamocorticalis kapcsoló neuronokban. A hiperpolarizáció által aktiválódó ionáram ( $I_h$ ) az akciós potenciált követően aktiválódik, és lassú depolarizációt vált ki, amely T-típusú  $Ca^{2+}$ -csatornák ( $I_t$ ) aktiválódásán keresztül újabb akciós potenciál kialakulásához vezet. Az akciós potenciál alatt az  $I_h$  deaktiválódása és az  $I_t$  inaktiválódása együttesen repolarizációt idéz elő. (Robinson és Siegelbaum, 2003)

A kisgyei Purkinje-sejtek magas frekvenciájú (40-50 Hz) spontán aktivitást mutatnak, amit  $K^+$ -,  $Ca^{2+}$ - és  $Na^+$ -áramok összetett kölcsönhatása idéz elő (Raman és Bean, 1999). Ezekben a sejtekben a hiperpolarizáció által aktiválódó ionáram nem vesz részt közvetlenül a pacemaker aktivitásban, inkább csak segíti más ionáramok ritmuskeltő működését azzal, hogy a membránpotenciált a megfelelő feszültségértékeken tartja. Az  $I_h$  specifikus antagonistájával (ZD7288) való blokkolása során a Purkinje sejtek állapota bistabillá válik, és elhúzódó spontán tüzelések és csendes periódusok váltogatják egymást (Williams és mtsai, 2002).

Az entorhinalis kéreg 2-es rétegében lévő csillagsejtek ritmikus aktivitása alacsony frekvenciájú (2-4 Hz) membránpotenciál-oszcillációk formájában nyilvánul meg (Alonso és Llinas, 1989). Kimutatták, hogy az  $I_h$  fontos tényező az entorhinalis kéreg csillagsejtjeinek oszcillációjában, mert az ionáram blokkolása gátolja a sejtek oszcillációját (Dickson és mtsai, 2000). A csillagsejtek membránpotenciál-oszcillációja a hippocampus jelentős bemenetét adja, és valószínű, hogy az asszociációs kéreg felől jövő információk integrációjában és szinkronizációjában játszik kulcsszerepet (Robinson és Siegelbaum, 2003).

#### **2. 3. 4. Az $I_h$ és a szinaptikus jelátvitel kapcsolata**

A hiperpolarizáció által kiváltott ionáram ( $I_h$ ) egyik legérdekesebb és legtöbbet vitatott szerepe az idegrendszerben a szinaptikus jelátvitel szabályozásában betöltött funkciója. Elektrofiziológiai mérésekkel számos preszinaptikus terminálisban kimutatták az  $I_h$  jelenlétét, például a madarak ganglion ciliare neuronjain, az emlősök kisagyú kosársejtjein, és a rákok neuromuszkuláris szinapszisainak axonterminálisain (Fletcher és Chiappinelli, 1992; Southan és mtsai, 2000; Beaumont és Zucker, 2000).

Az  $I_h$  szinaptikus jelátvitelt moduláló hatására a legérdekesebb bizonyíték, a rákok neuromuszkuláris szinapszisában szerotonin hatására kialakuló szinaptikus transzmisszió cAMP-függő, hosszan tartó facilitációja (LTF) (Beaumont és Zucker, 2000). Elektrofiziológiai vizsgálatokkal kimutatták, hogy az  $I_h$  blokkolása organikus (ZD7288) vagy inorganikus ( $\text{Cs}^+$ ) anyagokkal gátolta a szinaptikus facilitáció kialakulását. Az a mechanizmus, ami összeköti a HCN ioncsatornák aktivitását és a szinaptikus transzmisszió felerősödését még nem ismert, az első kezdeti kutatások azt mutatják, hogy a hosszú távú facilitáció aktin depolimerizáció hatására megszűnik. Felmerülhet annak a lehetősége, hogy a HCN-csatornák közvetlenül, a citoskeletális rendszeren keresztül kapcsolódhatnak a neurotransmitter-felszabadulás folyamatához, például úgy, hogy az aktin stabilizálja az ioncsatornák elhelyezkedését a szinapszisokban, vagy biztosítja a HCN-csatornák és a szekretoros fehérjék közti kapcsolatokat (Beaumont és Zucker, 2000; Beaumont és mtsai, 2002).

## **2. 4. A HCN ioncsatornák expressziója a gerincvelői dúcsejtekben és szerepe a fájdalom transzmissziójában**

A HCN ioncsatornák szív-érrendszeri és idegrendszeri expressziójának, illetve működésének feltérképezése után, az elmúlt évtizedben egyre inkább a figyelem középpontjába került ezen ioncsatornák szerepe az idegrendszer szomatoszenzoros működéseiben. Elsőként Mayer és Westbrook (1983) írta le a hiperpolarizáció által aktiválódó ionáram ( $I_h$ ) jelenlétét az egér embrió gerincvelői dúcainak sejtjeiben. Később, a HCN gének klónozását követően a HCN izoformák mindegyikét kimutatták az elsődleges érzőneuronokban, mRNS és fehérje szinten egyaránt (Moosmang és mtsai, 2001; Chaplan és mtsai, 2003, Yu és mtsai, 2004; Doan és mtsai, 2004).

A négy HCN izoforma különböző mértékben és eloszlásban expresszálódik a különféle méretű gerincvelői dúcsejtekben. Patkány gerincvelői dúcának primer szenzoros neuronjaiban a HCN1 fehérje szintetizálódik a legnagyobb mennyiségben, elsősorban a nagyméretű dúcsejtekben, de kismértékben a kis átmérőjű dúcsejtekben is kifejeződik. A HCN2 izoforma kisebb mennyiségben, a dúcsejtek mintegy felében expresszálódik. A HCN3 fehérje expresszió jóval alacsonyabb az előző két izoformához képest, a HCN4 izoforma pedig szinte alig detektálható a gerincvelői dúcsejtekben. A HCN fehérjék a primer afferensek sejttestjében elsődlegesen membránlokalizációt mutatnak (Chaplan és mtsai, 2003). A primer afferens neuronokban leírt HCN izoformák eloszlási mintázata szinte teljesen egybeesik a különböző méretű dúcsejtekben mért  $I_h$  biofizikai jellemzőivel (Scroggs és mtsai, 1994).

Jóllehet a HCN ioncsatornák expressziója a gerincvelői dúcsejtek sejttestjeiben viszonylag jól ismert, nem tudjuk, hogy az ioncsatorna-fehérjék transzportálódnak-e a sejttestből a perifériás és centrális axonterminálisokba, amelyek a bőrben és a gerincvelő hátsó szarvában végződnek. Bár myelinizált és myelinizálatlan szenzoros rostokban is leírták a hiperpolarizáció által aktiválódó ionáramot ( $I_h$ ), a HCN-csatornákat ezidáig még nem sikerült kimutatni sem magukban a szenzoros axonokban, sem azok perifériás vagy centrális végződéseiben (Baker és mtsai, 1987). Kutatásaink kezdetén a HCN ioncsatornák gerincvelői expressziójáról, illetve a nociceptív ingerületek gerincvelői áttevődésében betöltött szerepéről semmit sem tudunk.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3. 1. Kísérleti állatok és a szövetszövetek előkészítése

A fény- és elektronmikroszkópos immunhisztokémiai, illetve molekuláris biológiai vizsgálatainkat összesen 42 felnőtt (250-300g), illetve 9 háromhetes, hím patkányon (Wistar-Kyoto, Gödöllő) és 3, a glutaminsav-dekarboxiláz (GAD65) gént zölden fluoreszkáló fehérjét kódoló (eGFP) génnel társított, ún. GAD65-eGFP-s transzgenikus, felnőtt egéren végeztük (De Marchis és mtsai, 2004). A GAD65-eGFP-s egerekben a GAD65 enzim génjének promotor régiójához kapcsolták az eGFP markerfehérje génjét (De Marchis és mtsai, 2004). A kísérlethez a GAD65 3e/gfp5.5#35 vonalból származó transzgenikus egereket használtuk, amelyekben a GAD65 gén 6.5 – kbp szakasza irányítja az eGFP expresszióját, és így a fluoreszkáló fehérje kifejeződik a GABAerg neuronokban a központi idegrendszer számos területén, többek között a gerincvelőben is (Hughes és mtsai, 2005). Elektrofiziológiai vizsgálatainkhoz 3 hetes fiatal patkányokat használtunk.

Az alábbi kísérleti állatcsoportokkal dolgoztunk:

1. Fénymikroszkópos feldolgozásra szánt kezeletlen (3 állat) és operált (dorzális rhizotomiás) patkányok (3 állat), amelyeken DAB alapú immunperoxidáz reakciót végeztünk.

2. Elektronmikroszkópos feldolgozáshoz használt intakt állatok, amelyeken preembedding nanogold immunhisztokémiai reakciót végeztünk (3 állat).

3. Konfokális mikroszkópos feldolgozásra szánt kezeletlen állatok, amelyeken fluoreszcens kettős és hármas jelöléses immunhisztokémiai reakciót végeztünk (9 patkány és 3 GAD65-eGFP-egér).

4. Elektrofiziológiai mérésekhez használt 3 hetes patkányok (9 állat).

5. Teljes Freund-adjuváns (CFA) injekcióval kiváltott gyulladáshoz társuló fájdalomállapot vizsgálatához használt állatok (9 patkány), amelyeket 3 csoportba osztottunk: CFA-val (3 állat), fiziológiás sóoldattal injektált (3 állat) és kontroll csoport (3 állat).

6. Western blot elemzéshez használt állatok (15 patkány).

Az 1. 2. 3. és 5. csoportba tartozó állatokat nátrium-pentobarbitállal (50 mg/kg, i.p.) történő mély altatásban transzkardiálisan perfundáltuk, először Tyrode-oldattal, majd (a) 4% paraformaldehidet vagy (b) 4% paraformaldehidet, 0,05% glutáraldehidet

és 0,2% pikrinsavat tartalmazó fixálóval. A fixálást követően eltávolítottuk a gerincvelő lumbális szakaszát (L3-L5) és a 3. csoportból három állatnál a lumbális gerincvelői dúcokat is. A lumbális gerincvelő szegmentumokat és gerincvelői dúcokat egy éjszakára a megfelelő fixálóban utófixáltuk, majd krioprotekció céljából 10%-os és 20%-os szacharózoldatba helyeztük, amíg le nem sülyedtek. A fixálókat és a szacharózt is 0,1M-os foszfátpufferben (pH=7,4) oldottuk fel. A reagensek jobb penetrációja céljából a kivett gerincvelő-szegmentumokat és gerincvelői ganglionokat folyékony nitrogénben feltártuk, majd Vibratommal 50-60 µm-es úszó metszeteket készítettünk, amelyeket 0,1M-os foszfátpufferben alaposan átmostunk.

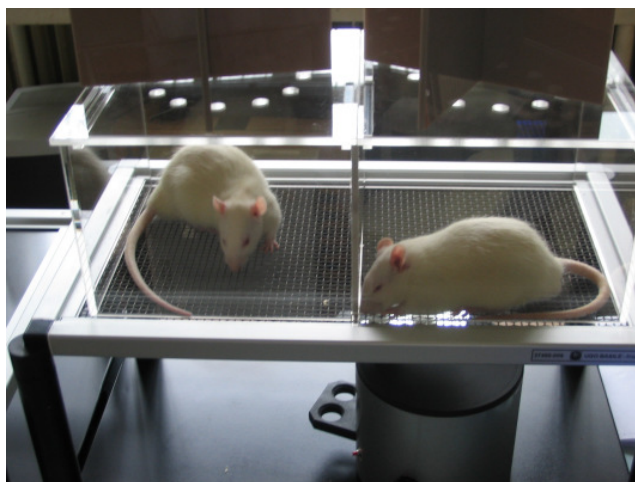
Három patkányon két héttel a transzkardiális perfúziót megelőzően dorzális rhizotomiát végeztünk. Ezen műtéti beavatkozás során mély altatásban (nátrium-pentobarbitál, 50 mg/kg, i.p.) laminectomia segítségével feltártuk a gerincvelő lumbális szakaszát, és unilaterálisan átvágtuk az L2-S1 gerincvelői hátsó gyökereket. Ezt követően bezártuk a műtéti sebet, és két hét túlélés után a fent leírtak alapján perfundáltuk az állatokat, illetve úszó metszeteket készítettünk az L4-es gerincvelői szegmentumból.

A teljes Freund-adjuvánssal (CFA) kiváltott gyulladási fájdalommodellben felhasznált 9 felnőtt, hím patkányt hármassal 3 csoportba osztottuk. Az egyik csoportnak fiziológiás sóoldattal 1:1 arányban hígított teljes Freund-adjuvánst (CFA, Sigma, St. Louis, MO, USA, 100 µl, CFA-val kiváltott gyulladást mutató állatok), a másik csoportnak fiziológiás sóoldatot (100 µl, fiziológiás sóoldattal injektált állatok) injektáltunk unilaterálisan, a jobb hátsó talp bőre alá. A harmadik csoport, amelyiken semmilyen beavatkozást nem végeztünk, maradt a kontroll csoport. Az injektálást megelőzően és követően 3-3 napig, naponta mértük az állatok talpának fokozatosan növekvő intenzitású, mechanikai ingerre adott reakciókészségét. Detektáltuk a krónikus gyulladás hatására kialakuló ingerküszöb-csökkenést (részletesebb leírását lásd a következő alfejezetben), majd az ingerküszöb-csökkenés maximumának elérését követően, az injektálást követő negyedik napon az állatokat perfundáltuk a fent leírtak szerint. A kivett gerincvelő-szegmentumokból (L3-L5) 60 µm-es úszó sorozatmetszeteket készítettünk, amelyeket a fentiekhez hasonlóan készítettünk elő az inkubálásra.

### 3. 2. Magatartásvizsgálat a mechanikai allodynia kimutatására

Az egyik leggyakrabban alkalmazott gyulladáscsökkentő fájdalommodellt, a Freund-adjuváns által kiváltott gyulladáscsökkentő fájdalommodellt választottuk a HCN2 ioncsatorna expressziójának gyulladáscsökkentő állapotban való vizsgálatára. Gyulladáscsökkentő fájdalom során a gyulladás helye és a vele közvetlen szomszédos területek hiperszenzitivitást és allodyniát mutatnak, ami olyan magatartási tünetekben nyilvánul meg, mint az alacsony intenzitású mechanikai ingerre mutatott fájdalmi reakció (mechanikai allodynia), vagy a fájdalmat kiváltó ingerekre fellépő túlzott, hosszan tartó fájdalom (hyperalgesia) (Woolf és Salter, 2000).

A Freund-modellben vizsgált állatok talpának mechanikai ingerre adott reakciókészségét a gyullasztás előtt és után 3-3 napig, naponta mértük egy „Dynamic Plantar Aesthesiometer” segítségével (Ugo Basile, Comerio, Olaszország) (9. ábra). A patkányokat egyesével a rácsozott aljzatú mérőhelyre tettük, majd az állatok hátsó talpát alulról, egy tompa, fémből készült filamentum (nyomószál) segítségével mechanikusan stimuláltuk, fokozatosan növekvő nyomóerővel (0-50 g). A mérések során azt a nyomóerőt detektáltuk, amelynél az állat visszahúzta a hátsó talpát a filamentumról. Vizsgálataink alkalmával a patkányok mindkét hátsó lábának talp visszahúzási küszöbértékét regisztráltuk, a gyullasztás előtt és azt követően. Kiszámítottuk az adatok átlagértékeit és standard középhibáját (SEM).



9. ábra. A gyulladáscsökkentő fájdalommodellben szereplő állatok mechanikai ingerre adott láb visszahúzási küszöbértékét a képen látható Dynamic Plantar Aesthesiometerrel mértük. A patkányokat rácsozott aljzatú mérőrekeszekbe helyeztük és hátsó talpaikat a mozgatható stimulátor tetején lévő fém nyomószál segítségével, növekvő nyomóerővel ingereltük. A mérőeszköz azokat a nyomóerőket regisztrálta, amelyeknél az állatok visszahúzták talpukat a nyomószálról. A magatartási vizsgálatok során azokat az eredményeket tekintettük pozitívnak, amikor az ingerlés során a patkányok akaratlagosan húzták vissza a talpukat a stimuláló fémszálról.

### 3. 3. Immunperoxidáz hisztokémiai vizsgálatok

A HCN2 ioncsatornák gerincvelői expressziójának kimutatására indirekt, DAB alapú immunperoxidáz módszert használtunk. A 3. 1. alfejezetben az első csoportban felsorolt kezeletlen és operált állatok lumbális gerincvelőiből származó úszó metszeteket először 20%-os normál kecske szérumban (NGS, Vector Labs., 0,01 M-os TPBS-ben oldva) 50 percig blokkoltuk, majd 1% NGS-t tartalmazó 0,01 M-os TPBS oldatban (pH=7,4) való átmosás után következett az antitestekkel történő inkubálás. Az antitesteket 1% NGS-t tartalmazó 0,01 M-os TPBS oldatban hígítottuk. A metszeteket először HCN2 ellen, nyúlban termeltetett primer antitesttel (1:400, Alomone Laboratories, Jeruzsálem, Izrael) inkubáltuk 2 napig 4 °C-on, majd alapos mosást követően (0,01 M TPBS 1% NGS) a metszeteket biotinilált, kecskében termelt, nyúl elleni (b-GAR) IgG-vel (1:200, Vector Labs., Burlingame, CA, USA) kezeltük (5-6 óra szobahőmérsékleten). Többszöri mosás (1% NGS TPBS-ben) után avidin-biotinilált tormaperoxidáz komplex-szel (ABC, 1:100, Vector Labs.) inkubáltuk a metszeteket egy éjszakán keresztül 4 °C-on, és végül az immunreakciót diaminobenzidin (DAB, Sigma, St. Louis, MO, USA) kromogén reakcióval tettük láthatóvá. A metszeteket zselatinozott tárgylemezre szedtük fel, majd felszálló alkoholsorban víztelenítettük, és Permount fedőanyaggal lefedtük.

Bár az általunk használt primer antitest (anti-HCN2, Alomone Labs.) specifitását korábban már immunoblot módszerrel igazolták (Idelson, 2001; Brass és Pharm, 2002), mi is teszteltük a HCN2 antitest specifitását saját metszeteinken, az antitest HCN2 peptiddel (Alomone Labs.) történő kimerítésével. A metszetek inkubálását megelőzően a HCN2 antitest-peptid 1:1 arányú (1-1 µg, 1,6 µg/ml koncentrációjú) keverékét 4 °C-on 16-18 óráig állni hagytuk, hogy összekapcsolódjanak, majd lecentrifugáltuk. A metszetekre az immunhisztokémiai eljárás során a HCN2 peptiddel előinkubált HCN2 antitestet tettük primer antiszérumként, ami nem tudott kötődni a szöveti HCN2 fehérjékhez, ezért ezek a metszetek nem mutattak specifikus immunfestődést.

Az immunhisztokémiai protokoll során használt szekunder antitest specifitásáról oly módon győződünk meg, hogy az inkubálás során bizonyos metszeteiken a primer antitestet normál nyúl szérummal (NRS, 1:100) helyettesítettük. Ezeken a metszeteiken nem tudtunk megfigyelni specifikus immunperoxidáz reakciót.

### **3. 4. Preembedding nanogold immunhisztokémiai vizsgálatok**

A HCN2-immunreaktív axonvégzödések ultrastrukturájának és a HCN2 fehérje szubcelluláris eloszlásának tanulmányozására elektronmikroszkópos vizsgálatokat végeztünk a 3.1. alfejezetben részletezett 2-es állatcsoporton. A 4% paraformaldehidet, 0,05% glutáraldehidet és 0,2% pikrinsavat tartalmazó fixálóval perfundált patkányok lumbális gerincvelőjéből származó 60 µm-es úszó metszeteket először 0,1 M-os foszfátpufferrel (PB) átmostuk, majd 1%-os nátrium-borohidrid (NaBH<sub>4</sub>, Sigma) oldattal kezeltük 30 percig. Ezután a metszeteket nyúlban termelt anti-HCN2-vel (1:400, Alomone Labs.) inkubáltuk 2 napig 4 °C-on, majd 1 nm-es aranszemcséhez kötött, kecskében termelt anti-nyúl IgG-t (GAR-Au, 1:100, Aurion, Wageningen, Hollandia) kapcsoltunk a primer antitesthez (6 óra szobahőn). Ismételt mosást (0,01 M TBS, pH 7,4) követően a metszeteket 2,5%-os glutáraldehiddel 10 percig utófixáltuk, majd ismét 0,01 M TBS-ben és 0,1 M PB-ben átmostuk. A szekunder antitesthez konjugált aranszemcséket ezüst intenzifikáló reagenssel történő kezeléssel (Aurion R-GENT, Aurion) tettük láthatóvá. Ezt követően a metszeteket 1%-os ozmium-tetroxiddal (OsO<sub>4</sub>, TAAB, Aldermaston, Berks, Anglia) 45 percig kezeltük, majd felszálló alkoholsorban és propilén-oxidban víztelenítettük, Durcupan ACM (Fluka, Buchs, Svájc) műgyantába ágyasztuk, majd tárgylemezre helyeztük, és a műgyantával lefedtük. A legszebb jelölést mutató metszetekből kivágtuk a hátsó szarvat, amelyet műanyag kapszulában újra beágyasztunk Durcupan ACM műgyantába. A műgyanta polimerizációja után az újraágyazott metszetekből ultravékony (60 nm) sorozatmetszeteket készítettünk, amelyeket Formvar-hártyával fedett, nikkel „slot” grid-ekre szedtünk fel és uranil-acetáttal (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA), illetve ólom-nitráttal (Reanal, Budapest) kontrasztoltunk meg.

### **3. 5. Immunfluoreszcens hisztokémiai vizsgálatok**

Annak érdekében, hogy kiderítsük, hogy a HCN2 ioncsatornák milyen típusú nociceptív primer afferensekben és intrinsic gerincvelői axonokban expresszálódnak, illetve, hogy ezek az axonok milyen posztszinaptikus kapcsolatokat alakítanak ki a gerincvelő felületes hátsó szarvában, a lumbális gerincvelőből és a gerincvelői dúcokból származó metszeteken fluoreszcens, kettős és hármas jelöléses immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk. A különböző eredetű axonok azonosítására a következő markereket használtuk:

(1) nociceptív primer afferensekre jellemző markerek: calcitonin génhez rendelt peptid (CGRP), izolektin-B4 (IB4) kötés és P-anyag (SP)

(2) gerincvelői intrinsic serkentő neuronális markerek: vezikuláris glutamát transzporter 1, 2 és 3 (VGluT1, 2, 3).

A HCN2-pozitív axonok posztszinaptikus célsejtjeinek vizsgálatához az alábbi markereket használtuk:

(1) serkentő interneuronok markerei: neurokinin1-receptor (NK1-R), calbindin D28k (CaB),  $\mu$ -opioid-receptor (MOR) és az AMPA-típusú glutamátreceptor 2-es alegysége (GluR2)

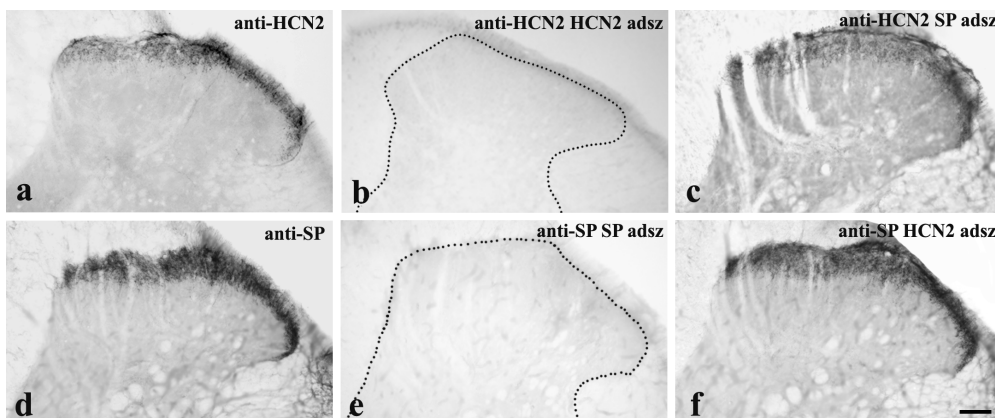
(2) gátló interneuronok markere: glutaminsav-dekarboxiláz 65-ös izoformája (GAD65) (GAD65-eGFP transzgenikus egerek).

A lumbális gerincvelőből és gerincvelői dúcokból származó, 50  $\mu$ m-es úszó metszeteket 20%-os normál kecske szérummal (NGS, Vector Labs.) vagy normál ló szérummal (NHS, Vector Labs.) 50 percig blokkoltuk, majd 1% NGS-t, vagy 1% NHS-t tartalmazó 0,01 M-os TPBS oldattal átmostuk. Ezt követően a metszeteket primer antitestek keverékével inkubáltuk 2 napig 4 °C-on. A kettős jelöléses immunfluoreszcens vizsgálatoknál a nyúlban termelt anti-HCN2 (1:200, Alomone Labs.) mellett a következő primer antitesteket használtuk: egérben termelt anti-SP (1:1000, Immundiagnostik AG, Bensheim, Németország), tengerimalacban termelt anti-VGluT1, 2 és 3 (1:5000, 1:2500, 1:5000; Chemicon, Hofheim, Németország), kecskében termelt anti-CaB (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), egérben termelt anti-GluR2 (1:1000, Chemicon), tengerimalacban termelt anti-MOR (1:4000, Chemicon) és egérben termelt anti-GFP (1:2000, Molecular Probes). Ezután a következő fluoreszcens festékekkel konjugált szekunder antiszérumok megfelelő keverékével inkubáltuk a metszeteket 5-6 óráig szobahőmérsékleten: Alexa Fluor 555-tel konjugált, kecskében termelt anti-nyúl IgG (GAR-Alexa Fluor 555, 1:1000, Molecular Probes, Eugene, OR, USA), Alexa Fluor 488-cal konjugált, kecskében termelt anti-egér IgG, vagy anti-tengerimalac IgG (GAM- vagy GAGp-Alexa Fluor 488, 1:1000, Molecular Probes), Cy5-tel konjugált, szamárban termelt anti-kecske IgG (DAG-Cy5, 1:100, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA), Alexa Fluor 488-cal konjugált, szamárban termelt anti-nyúl IgG (DAR-Alexa Fluor 488, 1:1000, Molecular Probes). Az antitesteket 1% NGS-t, vagy 1% NHS-t tartalmazó 0,01 M-os TPBS oldattal hígítottuk.

A hármas jelölésű immunfluoreszcens vizsgálatok során az alábbi primer antiszérumok keverékével inkubáltuk a metszeteket: (a) nyúlban termelt anti-HCN2 (1:200, Alomone Labs.), tengerimalacban termelt anti-CGRP (1:1000, Bachem AG) és biotinizált IB4 (1:200, Sigma), illetve (b) nyúlban termelt anti-HCN2 (1:200, Alomone Labs.), egérben termelt anti-SP (1:1000, Immundiagnostik AG) és tengerimalacban termelt anti-NK1-R (1:2000, Affinity Research Products, Exeter, UK). Keverék formájában, a primer antiszérumoknak megfelelően alkalmaztuk a fluoreszcens festékekkel konjugált szekunder antitesteket és jelölőanyagot. A következő szekunder antiszérumokkal és jelölőanyaggal dolgoztunk: (a) Alexa Fluor 633-mal konjugált, kecskében termelt anti-nyúl IgG (GAR-Alexa Fluor 633, 1:1000, Molecular Probes), Alexa Fluor 488-cal konjugált, kecskében termelt anti-tengerimalac IgG (GAGp-Alexa Fluor 488, 1:1000, Molecular Probes) és Alexa Fluor 546-tal konjugált streptavidin (1:2000, Molecular Probes), illetve (b) Alexa Fluor 555-tel konjugált, kecskében termelt anti-nyúl IgG (GAR-Alexa Fluor 555, 1:1000, Molecular Probes), biotinizált, lóban termelt anti-egér IgG (b-HAM, 1:200, Vector Labs.) és Alexa Fluor 488-cal konjugált, kecskében termelt anti-tengerimalac IgG (GAGp-Alexa Fluor 488, 1:1000, Molecular Probes). A biotinizált szekunder antitesttel megjelölt antigén vizualizálásához Alexa Fluor 647-tel konjugált streptavidinnel (1:2000, Molecular Probes) inkubáltuk a metszeteket 2-3 óráig szobahőmérsékleten. Az antitestek elegyét 1% NGS-sel kiegészített 0,01 M-os TPBS oldattal hígítottuk. Az inkubálás után a metszeteket tárgylemezre szedtük fel és Vectashield fedőanyaggal (Vector Labs.) fedtük le.

Az immunfluoreszcens metszeteket Olympus Fluoview FV1000 konfokális lézer scanning mikroszkóppal vizsgáltuk. A HCN2 immunreaktivitás preszinaptikus markerekkel való kolokalizációjának kvantitatív vizsgálatához a konfokális szoftver (Olympus Fluoview FV1000) NeuroLucida programját (MicroBrightfield Inc., Colchester, VT, USA) használtuk. Az elemzést három állatból származó, állatonként három, az L4-es gerincvelői szegmentumból való és erőteljes immunfestődést mutató konfokális metszet 1  $\mu$ m vastag optikai szeletén végeztük. Minden optikai szeleten véletlenszerűen kiválasztottunk 100, az egyik markerre immunfestett axonterminálist a hátsó szarv I-IIo laminájában, és megvizsgáltuk, hogy immunreaktív-e a másik markerre. A kvantitatív elemzés tehát összesen 900 axonvégződés vizsgálatán alapult minden markerpár esetén.

A HCN2 és a P-anyag (SP) immunreaktivitásának nagymértékű kolokalizációja felvetette a primer antitestek keresztreakciójának kérdését, ezért néhány metszeten úgy teszteltük az antitestek immunreaktivitását, hogy a HCN2 és SP antitesteket előzőleg HCN2 peptiddel (Alomone Labs.) és P-anyaggal (Immundiagnostik AG) kimerítettük. Az előkezelés során HCN2 peptiddel vagy P-anyaggal inkubáltuk a primer antitesteket (1 µg peptid /1µg antitest) 4°C-on 16-18 óráig, majd lecentrifugáltuk a keveréket. Az inkubálás során a peptidekkel kezelt antitesteket használtuk primer antitestként, amelyekhez a megfelelő biotinilált szekunder antitestet kapcsoltuk (b-GAR vagy b-HAM, 1:200, Vector Labs.). Az inkubálást ABC-reakcióval (1:100, Vector Labs.) fejeztük be, és az immunperoxidáz reakciót DAB (Sigma) kromogén reakció segítségével tettük láthatóvá. A HCN2-re jellemző immunfestődés a gerincvelő hátsó szarvának felületes lamináiban jelent meg (10. ábra a). A HCN2 peptid preadszorpciója saját antitestjéhez a specifikus immunfestődés elmaradását eredményezte (10. ábra b). Ezzel szemben nem változott meg a HCN2-re jellemző immunjelölés a hátsó szarvban, amikor az anti-HCN2-t P-anyaggal kezeltük az inkubálás előtt (10. ábra c). A P-anyag nagyon hasonló immunfestődést mutatott a HCN2 immunjelöléshez a gerincvelő hátsó szarvában (10. ábra d). Az anti-SP saját peptidjével való kimerítése során a specifikus immunjelölés teljesen eltűnt a hátsó szarvból (10. ábra e), míg a HCN2 peptiddel történő előkezelés után az SP immunfestődése változatlan formában jelent meg a hátsó szarv felületes lamináiban (10. ábra f).



**10. ábra.** A HCN2 és a SP antitest keresztreakciójának tesztelése kimerítéses kontroll vizsgálatokkal. Az *a* és *d* mikrofotókon a HCN2 és SP immunfestődés látható a gerincvelő felületes hátsó szarvában. A *b* és *e* felvételek az antitesteknek megfelelő peptiddel történő kimerítés után mutatják a gerincvelő hátsó szarvát, ahol teljesen eltűnt a specifikus immunjelölés. A *c* és *f* mikrofotókon az antitestek nem saját peptiddel történő, ún. keresztkimerítése után látható, hogy a HCN2-re és SP-re jellemző immunfestődés szinte változatlanul megmaradt a gerincvelői hátsó szarv I-IIo laminájában. Lépték: 100 µm.

### 3. 6. Elektrofiziológiai vizsgálatok

Annak érdekében, hogy a HCN2 ioncsatornák szerepét vizsgáljuk a HCN2-immunreaktív primer afferens terminálisok és a gerincvelői érző neuronok közötti szinaptikus jelátvitelben, háromhetes patkányokon (Wistar-Kyoto) elektrofiziológiai vizsgálatokat végeztünk. Izofluránnal történő mély altatás során dekapitáltuk az állatokat, majd eltávolítottuk a lumbális gerincvelőt és 95% O<sub>2</sub>-t és 5% CO<sub>2</sub>-t tartalmazó gázeleggyel oxigenizált, mesterséges cerebrospinalis folyadékba (pH 7,4) helyeztük, ami 130 mM NaCl-t, 24 mM NaHCO<sub>3</sub>-t, 3,5 mM KCl-t, 1,25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-t, 1 mM CaCl<sub>2</sub>-t, 3 mM MgSO<sub>4</sub>-t és 10 mM glükózt tartalmazott. A gerincvelő burkainak eltávolítása után, a hátsó gyökereket is magában foglaló gerincvelői blokkokat (7-9 mm hosszú) agarba ágyasztuk, és 400-600 µm-es szeleteket készítettünk belőlük Vibratommal. A hátsó gyökereket tartalmazó túlélő gerincvelő szeletpreparátumokat mesterséges cerebrospinalis folyadékban inkubáltuk a mérések előtt 1 óráig szobahőmérsékleten.

Az elektrofiziológiai mérések során a gerincvelő szeleteket oxigenizált, mesterséges agygerincvelői folyadékkal folyamatosan átáramoltatott mérőkádban tartottuk. A gerincvelő I-II. laminájában elhelyezkedő neuronokat, 40x-es vízimmerziós lencsével, interferencia kontrasztszűrővel és infravörös kamerarendszerrel (Hamamatsu, Japán) felszerelt Zeiss Axioskop FS mikroszkóppal (Zeiss, Németország) azonosítottuk. A gerincvelő hátsó gyökerére stimuláló elektródot helyeztünk és az ingerlés hatására az I-II. lamina egyedi neuronjain kiváltott posztszinaptikus válaszokat teljes sejt patch-clamp regisztrálással, current-clamp módban mértük. A mérésekhez 4-6 MΩ ellenállású patch-pipettát és Axoclamp ID erősítőt (Axon Instruments, Union City, CA, USA) használtunk. A mikroelektrodban lévő oldat 124 mM K-glukonátot, 14 mM NaCl-t, 1 mM Mg-ATP-t, 0,3 mM Na-GTP-t és 10 mM HEPES-t tartalmazott. A regisztrálásokat szobahőmérsékleten végeztük.

A hátsó gyökereket 0,2 Hz-en, 0,5-2,0 mA erősségű 0,1 ms-ig tartó áramimpulzusokkal stimuláltuk, BioSTIM biológiai stimulátor (Supertech, Pécs) segítségével. A stimulált rostok vezetési sebességét az intracelluláris válaszok látenciájából és a hátsó gyökér hosszából számoltuk ki. A mérések során azon hátsó szarvi neuronok spontán és stimulációval kiváltott serkentő posztszinaptikus potenciáljait (EPSP), valamint akciós potenciáljait regisztráltuk, amelyek monoszinaptikus bemeneteket kaptak a C és/vagy Aδ primer afferensektől (vezetési

sebesség: 0,3-0,8 m/s és 3,8-15,0 m/s, Kawasaki és mtsai., 2003). A szinaptikus jelátvitel hibaszázalékát tíz egymást követő hátsó gyökér stimulációra számoltuk ki, és azon stimulációk számában adtuk meg, amelyek nem váltottak ki EPSP-t a posztszinaptikus neuronon. Miután kontroll körülmények között regisztráltuk a serkentő posztszinaptikus potenciálokat, a HCN ioncsatorna működésének hatását vizsgálva, blokkolójának, 10  $\mu$ M ZD7288, alkalmazása mellett (10 perc) mértük az I-II-es lamina sejteinek posztszinaptikus válaszait (Harris és Constanti, 1995; Pal és mtsai, 2003). Végül folyamatos regisztrálás mellett kimostuk a ZD7288-at a fürdőfolyadékból.

Az adatokat digitalizáltuk (Digidata 1320, Axon Instruments), és IBM számítógépen rögzítettük. A mérések adatait Pclamp (Axon Instruments), Origin (Microcal Software, Northampton, MA, USA) és Whole Cell Program and Electrophysiology Data Recorder (Dr J. Dempster, Strathclyde Egyetem, UK) szoftverek segítségével elemeztük. A szinaptikus jelátvitel hibaszázalékai között, a mérés kezdetén, illetve a ZD7288 alkalmazásának kezdeti, késői fázisában és kimosása során megfigyelt különbségeket kétmintás párosított t-próbával értékeltük ki statisztikailag, és a  $p < 0,01$  értékeket tekintettük szignifikánsnak.

### **3. 7. Immunhisztokémiai vizsgálatok a Freund-adjuvánssal indukált gyulladásos fájdalommodellben**

A gyulladásos modellkísérletbe bevont állatokat (9 patkány) a korábban említett három csoportba osztottuk: (1.) Freund-adjuváns injekció az egyik oldali talpba, (2.) fiziológiás sóoldat injekció az egyik oldali talpba és (3.) kontroll állatok. Az első két csoport jobb hátsó talpába a 3. 1. alpontban leírt módon hígított CFA-t vagy fiziológiás sóoldatot injektáltunk. Az injektálást megelőzően és követően mindhárom állatcsoporton magatartási vizsgálatokat végeztünk, a 3. 2. alfejezetben leírtak szerint, majd transzkardiálisan perfundáltuk az állatokat.

A lumbális gerincvelő szegmentumokból (L3-L5) készült sorozatmetszeteket négy csoportba osztottuk úgy, hogy minden negyedik kerüljön egy csoportba, és a különböző csoportban lévő, egyébként szomszédos metszeteket különféle immunhisztokémiai protokollok szerint inkubáltuk:

1. HCN2 immunfestés DAB alapú immunperoxidáz módszerrel,
2. c-Fos fehérje immunjelölés immunperoxidáz módszer segítségével,
3. HCN2 és SP immunfestés kettős jelöléses, immunfluoreszcens eljárással, és

#### 4. későbbi inkubálásra eltett tartalék metszetek.

A HCN2 ioncsatornák expresszióját, illetve a krónikus gyulladás hatására bekövetkező esetleges változását a gerincvelő hátsó szarvában, a 3. 3. alfejezetben ismertetett immunperoxidáz módszerrel vizsgáltuk az 1. csoport metszetein. Az inkubálás az előzőleg leírtak alapján zajlott, először anti-HCN2-vel (1:10000, Alomone Labs.), majd biotinilált GAR-IgG-vel (1:200, Vector Labs.) és végül ABC-vel (1:100, Vector Labs.) inkubáltuk a metszeteket. Az immunjelölést DAB kromogén reakcióval tettük láthatóvá.

Az L4-es szegmentum metszeteiről, Spot kamerával felszerelt Nikon Eclipse mikroszkóppal fénymikroszkópos felvételeket készítettünk. A felvételeken az immunfestés küszöbértékeinek beállítását követően, Image J program segítségével megmértük az immunreaktív területek nagyságát a felületes hátsó szarv mediális, intermedier és laterális régióiban, illetve az I-II-es lamina teljes mediolaterális területén.

Annak érdekében, hogy a hátsó szarvi neuronoknak a Freund-adjuváns injekciójával kiváltott gyulladás hatására megnövekedett aktivitását kimutassuk, a HCN2-re immunfestett metszetek szomszédos metszetein (2. csoport) az immediate early gene géncsaládhoz tartozó c-Fos géntermék, a c-Fos fehérje immunreaktivitását vizsgáltuk, ugyancsak immunperoxidáz módszerrel. A metszeteket nyúlban termelt anti-c-Fos (1:8000, Santa Cruz Biotech., USA) szérummal, majd ennek megfelelő biotinilált szekunder szérummal (b-GAR IgG, 1:200, Vector Labs.), és legvégül ABC komplexszel (1:100, Vector Labs.) inkubáltuk. Az immunreakciót DAB kromogén reakcióval tettük láthatóvá.

A c-Fos-pozitív sejteket egy Leica fénymikroszkópra szerelt Leitz Laborlux S típusú camera lucida segítségével rajzoltuk ki a lumbális gerincvelő hátsó szarvának I-II-es laminájában. A kirajzolt sorozatmetszetekből háromdimenziós rekonstrukciót készítettünk a Neurolucida program (MicroBrightField, Williston, VT, USA) Solid moduljának segítségével, ami a c-Fos-immunreaktív sejtek eloszlását mutatja az L4-es lumbális gerincvelő felületes hátsó szarvában.

Az L4-es szegmentumból származó c-Fos fehérjére festett metszeten kvantitatív elemzést végeztünk. A vizsgált metszeten a felületes hátsó szarvat mediolaterálisan három régióra osztottuk (mediális, intermedier és laterális), és régiónként, illetve a hátsó szarv teljes mediolaterális kiterjedésében megszámoltuk a c-Fos-immunreaktív sejteket. A számolást 3-3 CFA injekciót kapott és kontroll patkány

metszetein (10 metszet / állat) mindkét oldali hátsó szarv I-II-es laminájában elvégeztük.

A HCN2 és SP expressziójának, illetve kolokalizációjának tanulmányozására a 3. csoport metszetein kettős jelöléses, immunfluoreszcens módszert használtunk. A metszeteket blokkolást (20% NGS) és 1% NGS tartalmú TPBS mosást követően, nyúlban termelt anti-HCN2 (1:5000, Alomone Labs.) és egérben termelt anti-SP (1:1000, Immundiagnostik AG) keverékével inkubáltuk (2 nap 4 °C-on). Ezután Alexa Fluor 555-tel és 488-cal konjugált, kecskében termelt anti-nyúl IgG és anti-egér IgG elegyével (GAR-Alexa Fluor 555, 1:1000; GAM-Alexa Fluor 488, 1:1000, Molecular Probs.) kezeltük a metszeteket (5-6 óra szobahőn). Az inkubálás végén a metszeteket tárgylemezre szedtük fel és lefedtük (Vectashield).

A fluoreszcens metszetekről Olympus Fluoview 1000 típusú konfokális mikroszkóppal felvételeket készítettünk. A felvételeken kvantitatív elemzést végeztünk a felületes hátsó szarv fentebb említett régióiban, a következő módon. Az 1 µm vastag konfokális optikai felvételekre egy 10x10-es, 4µm-es beosztású standard négyzetrácsot helyeztünk, és megszámloltuk a rács oldalaira eső egyszeresen, HCN2-re vagy SP-re, illetve kettősen, mindkét markerre festődő axonterminálisokat. Az eredmények 3-3 kontroll és hígított Freund-adjuvánssal injektált patkány, összesen 60 metszetének adataiból származnak.

A kvantitatív elemzések során kiszámoltuk az adatok átlagértékeit és standard középhibáját (SEM), és egyváltozós ANOVA módszerrel a különbségek szignifikanciáját. A különböző mértékű szignifikanciaszinteket egy, kettő, illetve három csillaggal jelöltük (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### **3. 8. Western blot elemzés**

Az elemzéshez 15 felnőtt, hím patkányt (Wistar-Kyoto) használtunk, amelyek közül kilencnél, hígított teljes Freund-adjuvánssal (CFA) unilaterális talpgyulladászt végeztünk a 3. 1. alfejezetben leírtak alapján. Az injektálást megelőzően és követően is megmértük az állatok nociceptív válaszkészségét a Dynamic Plantar Aesthesiometerrel, és a mechanikai allodynia kialakulását követően, a gyullasztás utáni negyedik napon, dietil-éteres (Spektrum 3-D) túlaltatást követően kivettük az állatok lumbális gerincvelőjét (L3-L5). A kísérletekhez hat intakt patkányt használtunk kontrollként, amelyekből szintén eltávolítottuk a gerincvelő L3-L5 szegmentumait.

A lumbális gerincvelők hátsó szarvai kerültek feldolgozásra oly módon, hogy a minták egy részénél membránpreparálást követően csak membránfrakciót, a másik részénél pedig teljes szövételizátumot vizsgáltunk. Membránpreparálás során a szövetmintákat először proteáz inhibitorral kiegészített 20 mM TRIS-ben (pH 7,4) ultrahangos módszerrel feltártuk, majd a homogenizátumot ultracentrifugával (50 000 g) 4 °C-on 90 percig centrifugáltuk. Ezután a felülúszót leöntve, az üledéket 1% Triton-X 100-at tartalmazó lízispufferben (20 mM TRIS, 137 mM NaCl, pH 7.4) feloldottuk, majd 50 000 g-n 4 °C-on 55 percig centrifugáltuk. A membránból kioldódott fehérjét tartalmazó felülúszóval dolgoztunk a továbbiakban. A szövetminták másik részét, folyékony nitrogénben történő feltárást követően, 2% Triton-X 100-at és proteáz inhibitorral tartalmazó 20 mM-os TRIS-ben feloldottuk, és 16 000 g-n 4 °C-on 10 percig centrifugáltuk. Az üledék eltávolítása után a felülúszón végeztük el a Western blot analízist.

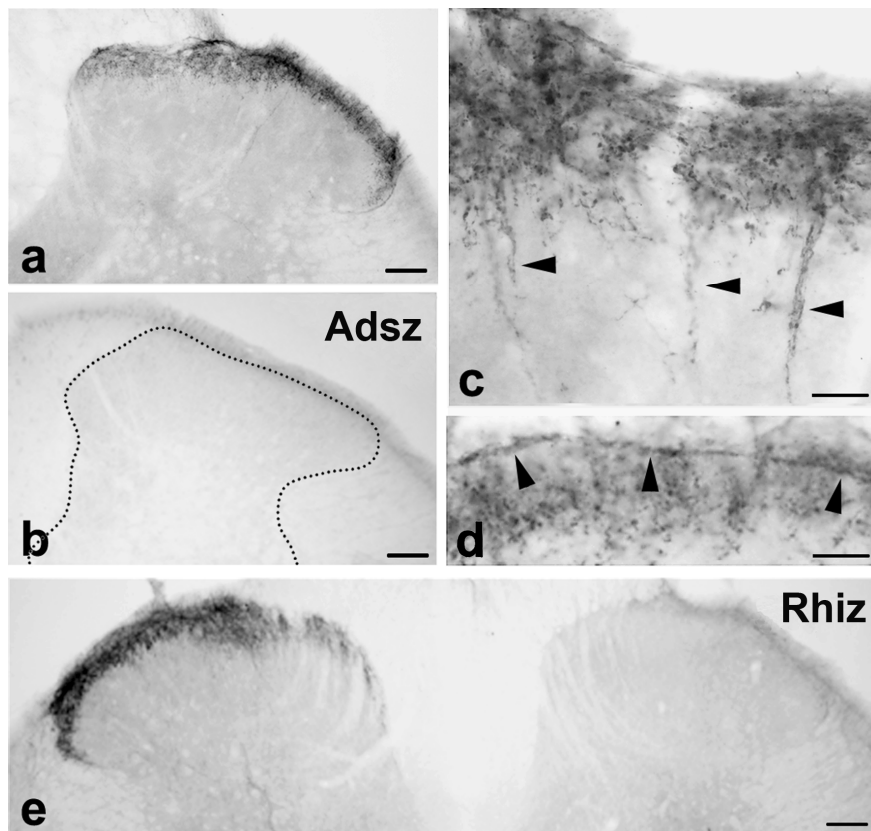
Mind a membránfrakcióból, mind a teljes lizátumból származó felülúszót redukáló mintapufferben feloldottuk, és sávonként 35 µg fehérjét vittünk fel, amit 10%-os SDS-poliakrilamid gélen megfuttattunk (a Laemmli-módszer szerint). Az elválasztott fehérjét elektroforetikusán vittük át PVDF membránra (Millipore). A membránokat 10% normál borjú szérumot (NBS, Sigma) tartalmazó TTBS oldattal (0,05% Tween-20-al kiegészített Tris-sel pufferolt sóoldat) blokkoltuk, majd nyúlban termelt anti-HCN2-vel (1:1000, Alomone Labs.) és loading kontroll antitesttel (egérben termelt anti-β-tubulin, 1:4000, Sigma) inkubáltuk szobahőmérsékleten 2 óráig. Többszöri TTBS mosást követően az antitestekhez biotinilált anti-nyúl IgG-t, illetve biotinilált anti-egér IgG-t (1:200, Vector Labs.), majd ABC-komplexet (1:100, Vector Labs.) kapcsoltunk. Az immunjelölt fehérjesávokat DAB (Sigma) kromogén reakcióval tettük láthatóvá.

A kísérletekből származó immunoblotokat Gelcapture program segítségével fényképeztük le. Az immunoblotok eredményein Gelquant programmal denzitometriás elemzést végeztünk, majd a kapott adatokat a belső, loading kontroll (β-tubulin) értékeire normalizáltuk. Kiszámoltuk az átlagértékek standard középhibáját (SEM), és egyváltozós ANOVA módszerrel statisztikai elemzést végeztünk. Szignifikánsnak a  $p < 0,05$  értékeket tekintettük.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4. 1. HCN2 immunreaktivitás a gerincvelő hátsó szarvában

Az immunperoxidáz hisztokémiai vizsgálatok alapján azt találtuk, hogy a HCN2 immunreaktivitás a gerincvelői felületes hátsó szarv I-es laminájában és a II-es lamina külső részében (IIo) erőteljes pontszerű festődést mutatott (11. ábra a). Több esetben az immunjelölt pontokat hosszanti sorokba rendeződve találtuk a fehér- és szürkeállomány határával párhuzamosan elhelyezkedve az I-es laminában (11. ábra d), illetve beterve a hátsó szarv mélyebb lamináiba (11. ábra c). A hátsó szarv felületes lamináiban megfigyelhető erős immunfestődéssel szemben, a mélyebb laminák nem mutattak immunjelölődést. Ezen kívül fontos megjegyeznünk, hogy a HCN2 immunreaktivitás egyáltalán nem adott szomatikus vagy dendritikus immunfestődést a patkány lumbális gerincvelőjének hátsó szarvában (11. ábra a, c, d).



11. ábra. A HCN2 immunreaktivitás pontszerű, terminális jelölődést mutat a lumbális gerincvelő hátsó szarvának I-IIo laminájában. A *c* és *d* mikrofotón látható nyílhegyek az immunreaktív axonterminálisok hosszanti sorokba rendeződését mutatják az I-es laminában (*d*) és a mélyebb laminákba beterve (*c*). A *b* felvételen a HCN2 antitest HCN2 peptiddel való kimerítése, az *e* mikrofotón a dorsalis rhizotomia okozta az immunfestődés eltűnését. Lépték: 100  $\mu$ m (a, b, e), 20  $\mu$ m (c, d).

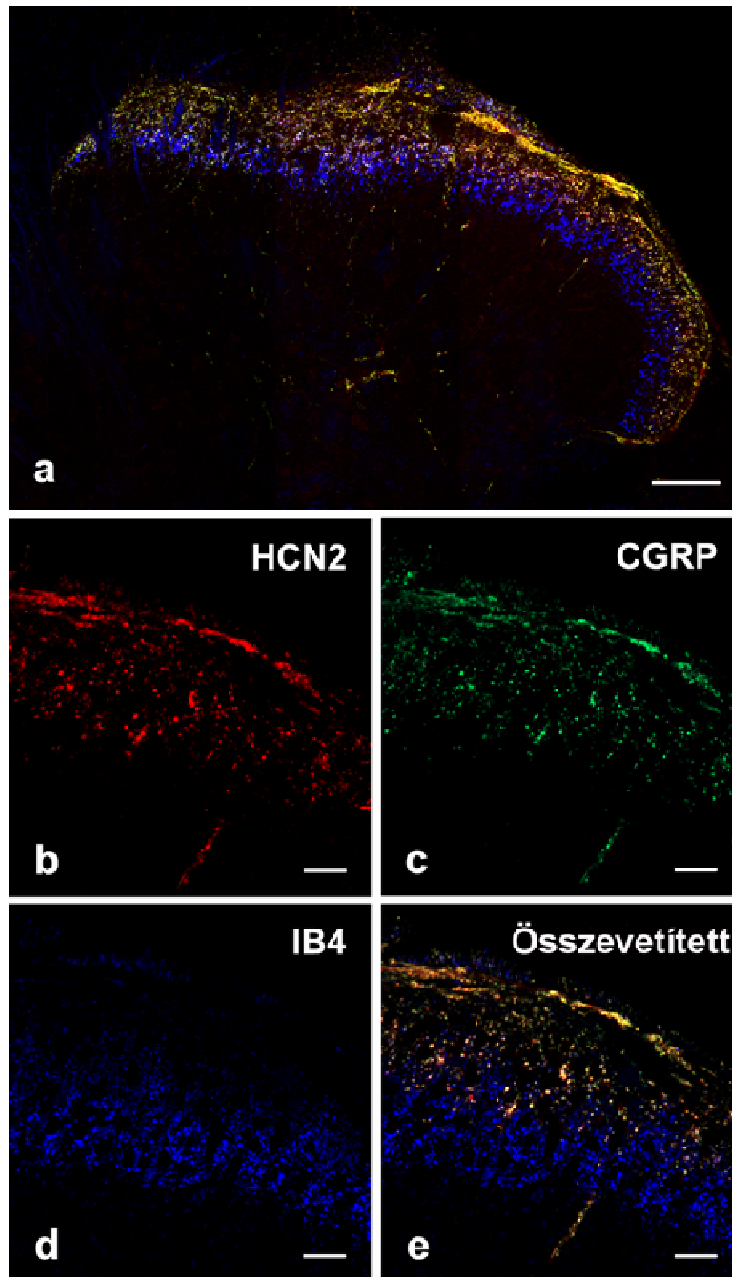
Ha az inkubálást olyan HCN2 antitesttel végeztük, amelyet korábban HCN2 fehérjével kimerítettünk, a gerincvelő immunfestődést nem mutatott (11. ábra b). Az L2-S1 gerincvelői szegmentumban végzett dorsalis rhizotomiát követően az L4-es gerincvelői szegmentumból az immunjelölés tökéletesen eltűnt, jelezve, hogy az I-IIo lamina immunreaktivitását az itt végződő nociceptív primer afferensek axonvégződése adják (11. ábra e).

#### **4. 2. A HCN2 immunreaktivitás és a peptiderg, illetve nem-peptiderg primer afferensek kapcsolata**

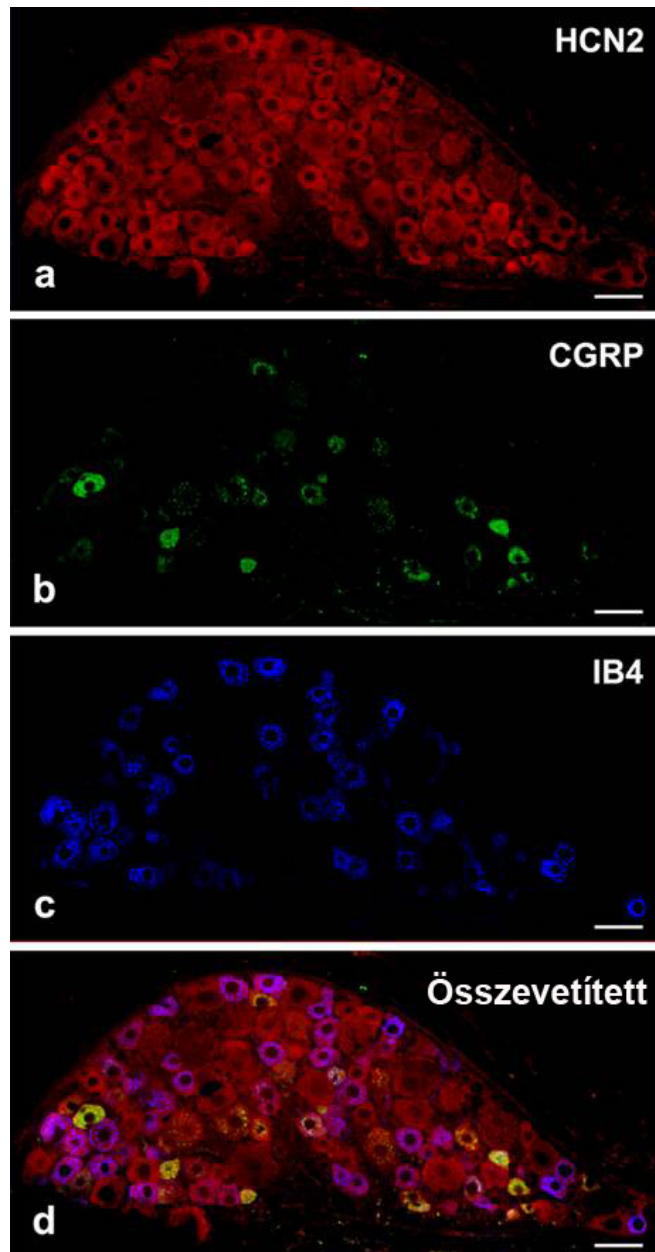
Annak érdekében, hogy további adatokat gyűjtsünk arra vonatkozólag, hogy valóban primer afferensek terminálisai adják a HCN2 immunfestődést a hátsó szarv I-IIo laminájában, és megállapítsuk, hogy ezek peptiderg, vagy nem-peptiderg típusúak, hármass jelölésű immunfluoreszcens módszerrel vizsgáltuk a HCN2 kolokalizációját CGRP-vel és IB4 kötődéssel. A CGRP-t a peptiderg nociceptív primer afferensek jelölésére használtuk, mert ezt a neuropeptidet a peptiderg nociceptív primer afferensek jelentős része expresszálja (Lawson, 1995), míg az IB4 kötődés a nem-peptiderg nociceptív primer afferensek markereként használható (Gerke és Plenderleith, 2002).

A gerincvelő hátsó szarvában, az irodalmi adatoknak megfelelően, a CGRP-immunreaktív axonterminálisok az I-IIo laminákban mutattak immunfestődést (12. ábra c), míg az IB4 kötődést mutató terminálisok szinte kizárólag a II-es lamina belső részében (IIi) jelentek meg (12. ábra d) (Lawson, 1995, Gerke és Plenderleith, 2002). A hármass jelölésű konfokális felvételeken (12. ábra a, e) jól látszik, hogy a HCN2 és a CGRP immunreaktivitás jelentős kolokalizációt mutatott a hátsó szarv I-IIo lamináiban. Ugyanakkor a HCN2-immunreaktív axonvégzések az IB4 kötődést mutató nem-peptiderg terminálisoktól szinte teljesen szegregálódtak (12. ábra a, e).

Érdekes módon, a gerincvelői dúcsejtek sokkal kiterjedtebben mutattak HCN2 immunreaktivitást, mint ahogyan azt a gerincvelői megoszlásból várni lehetett volna. Gyakorlatilag a dúcsejtek mindegyike pozitívnak bizonyult HCN2-re (13. ábra a), ahogyan azt már Chaplan és mtsai. (2003) korábban is kimutatták, többek között mind a CGRP-immunreaktívok (13. ábra b), mind az IB4 kötődést mutatóak (13. ábra c) pozitívan festődtek HCN2-re is (13. ábra d).



12. ábra. A HCN2 immunreaktivitás kolokalizációja CGRP immunreaktivitással és szegregációja az IB4 kötődéstől a lumbális gerincvelő hátsó szarvában. A hármasan jelölt 1  $\mu$ m vastag konfokális optikai szeleten a HCN2 (piros), a CGRP (zöld) immunfestődés és az IB4 kötődés (kék) látható a gerincvelő felületes hátsó szarvában (a). A három nagyobb nagyítású 1  $\mu$ m vastag konfokális felvétel a felületes hátsó szarv laterális részén mutatja a HCN2 (b, piros), a CGRP (c, zöld) immunfestődését és az IB4 kötődését (d, kék) (b-d). Az összevetített *a* és *e* konfokális felvételeken megjelenő sárga szín a HCN2 és CGRP immunreaktivitás erőteljes kolokalizációját, az elkülönülő kék szín pedig az IB4 kötődés teljes szegregációját jelzi. Lépték: 100  $\mu$ m (a), 20  $\mu$ m (b-e).



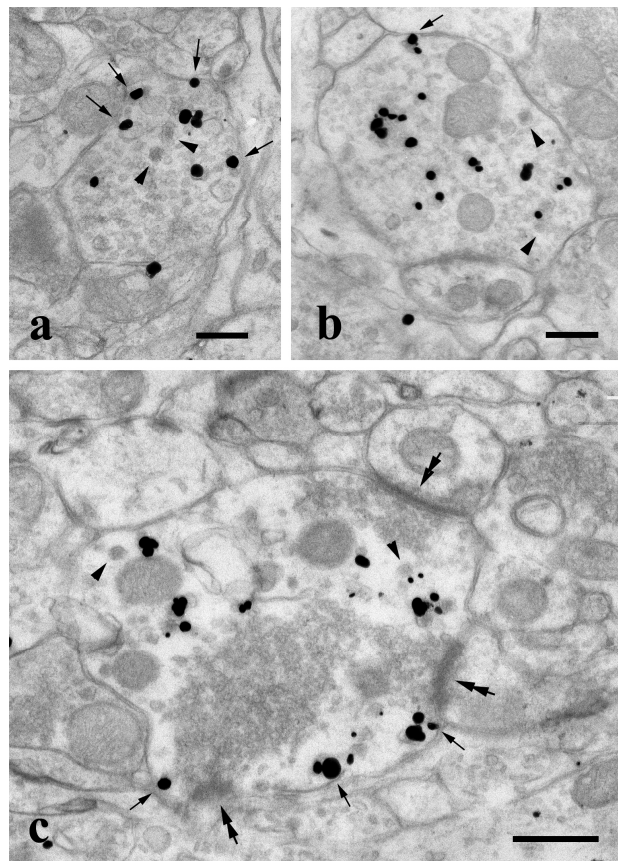
13. ábra. A HCN2 immunreaktivitás kolokalizációja CGRP immunreaktivitással és IB4 kötődéssel a gerincvelői dúcban. A hármasan jelölt 1  $\mu$ m vastag konfokális optikai szelet azt mutatja, hogy a gerincvelői dúcsejtek nagy része HCN2-immunreaktív (a, piros), amelyek közül a CGRP-immunreaktív (b, zöld), illetve IB4-pozitív (c, kék) dúcsejtekkel kolokalizálóak sárga és lila színben láthatóak az egymásra vetített konfokális felvételen (d). Lépték: 50  $\mu$ m.

#### 4. 3. HCN2 fehérjék szubcelluláris megoszlása a peptiderg nociceptív primer afferensek axonterminálásaiban

A HCN2-re immunfestett neuronális elemek ultrastruktúráját preembedding nanogold immunhisztokémiai módszer segítségével vizsgáltuk a gerincvelő felületes hátsó szarvában. A HCN2 molekulákat jelölő ezüstszemcséket kizárólag 0,5-2,5  $\mu$ m átmérőjű axonvégzódésekben találtuk, glianyúlványok és idegsejtek dendritjei vagy

sejttestjei nem mutattak HCN2 immunjelölést. Az immunreaktív axonterminálisok glomeruláris és nem-glomeruláris típusú szinaptikus elrendezésben egyaránt megtalálhatóak voltak (14. ábra), és a glomeruláris szinapszisoknál mindig a központi axonvégzódések mutattak immunreakciót (14. ábra c). Az immunreaktív axonterminálisok szinte mindegyikében, a szinaptikus vezikulák között elszórtan dense core vezikulákat is találtunk, amelyek a peptiderg axonvégzódésekre jellemzőek.

A HCN2 fehérjéket jelző szemcsék szubcelluláris megoszlását vizsgálva, az axoplazmában található szemcsék mellett a terminálisok sejtmembránjához tapadva is gyakran találtunk jelölődést (14. ábra a, b). A membránhoz asszociált ezüstszemcsék a membrán intracelluláris oldalán jelentek meg, jelezve, hogy az ioncsatorna N-terminálisa, amihez az antitestünk kapcsolódott, intracelluláris helyzetű. A membránhoz kötött ezüstszemcsék mindig extraszinaptikus lokalizációt mutattak, bár közülük néhány a szinaptikus appozíció közvetlen szomszédságában helyezkedett el (14. ábra c).



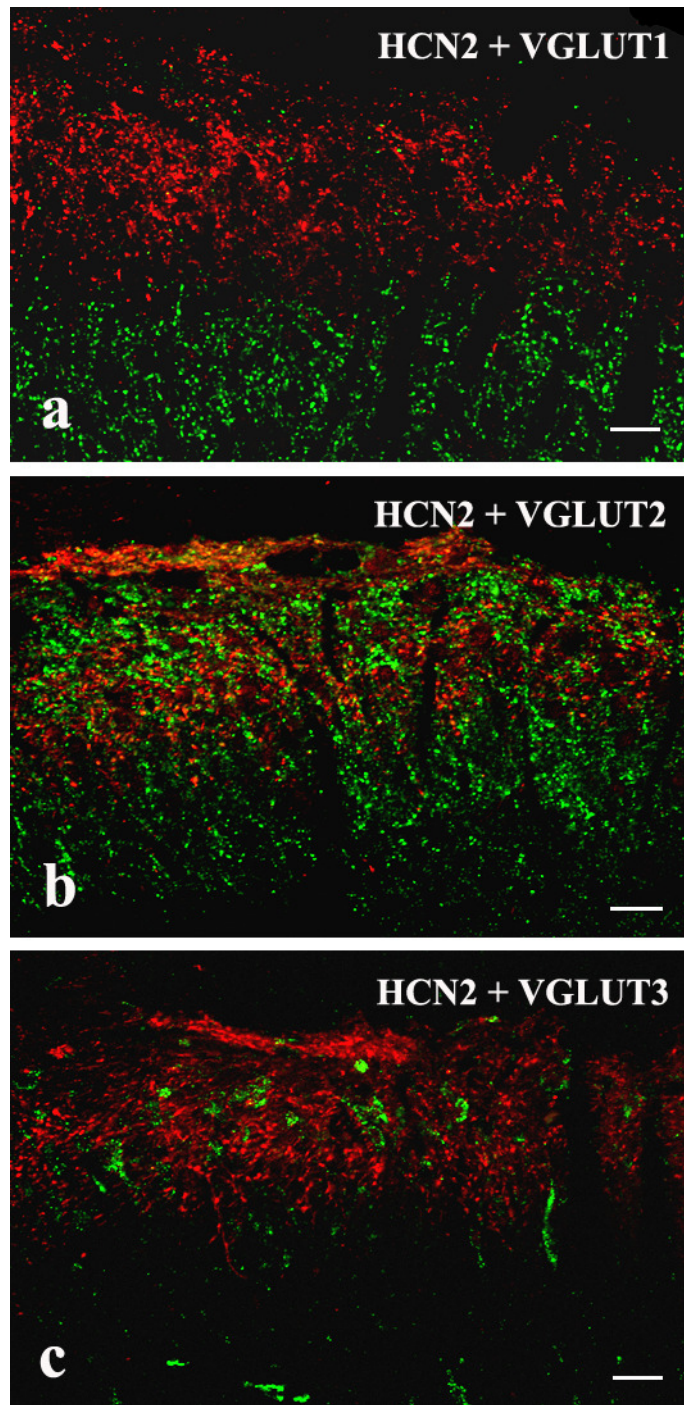
**14. ábra.** A HCN2 fehérjék szubcelluláris eloszlása a primer afferensek axonterminálisaiban a gerincvelő felületes hátsó szarvában. A HCN2 fehérjéket jelölő ezüstszemcsék egy része az axoplazmában, másik része a sejtmembránhoz tapadva, extraszinaptikusan található. A nyílhegyek dense core vezikulákat, a nyilak plazmamembránhoz asszociált HCN2 fehérjéket (a, b) és a kettős nyilak szinaptikus kapcsolatokat mutatnak (c). Lépték: 250 nm.

#### **4. 4. A HCN2 ioncsatornák kolokalizációja vezikuláris glutamát transzporterekkel és P-anyaggal**

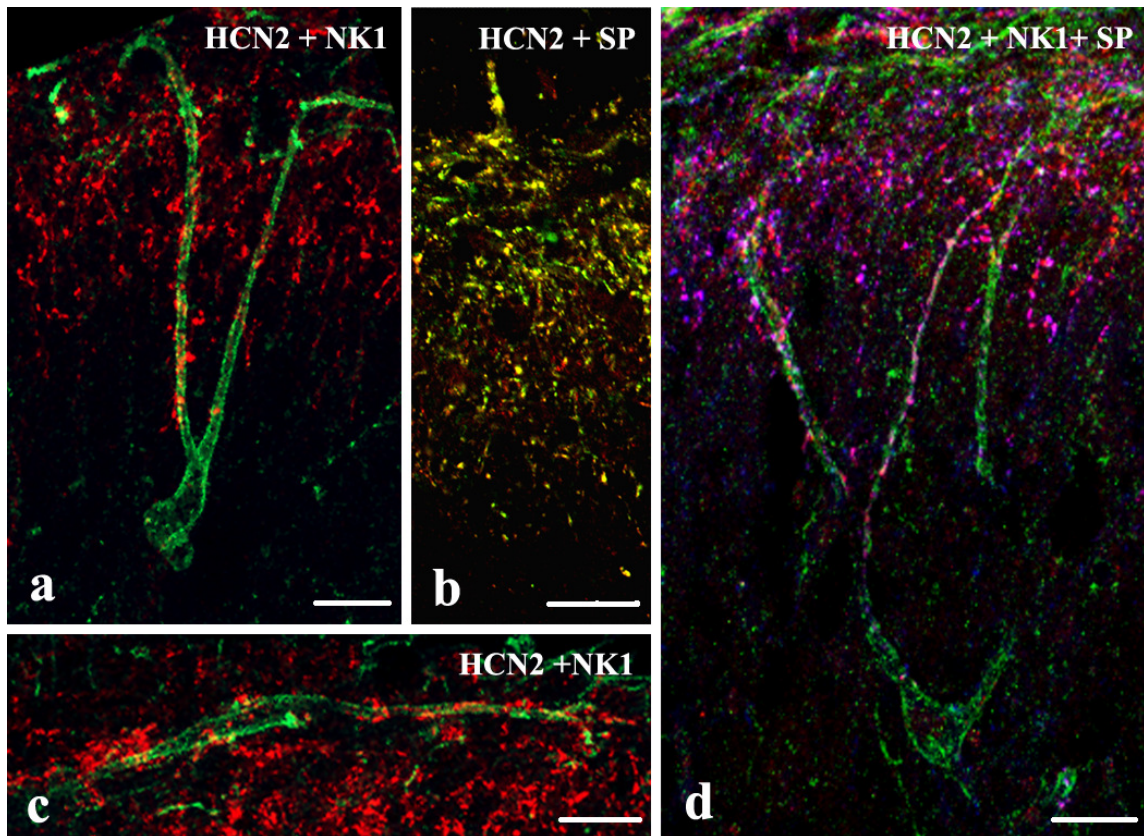
A HCN2-immunreaktív peptiderg nociceptív primer afferens terminálisok preszinaptikus jellemzőinek, elsősorban lehetséges neurotranszmittereinek tanulmányozására kettős jelöléses immunfluoreszcens módszert használtunk. A HCN2-pozitív axonvégzódések glutamát tartalmának kimutatásához a glutamát erg terminálisok legjellemzőbb markereinek, a vezikuláris glutamát transzportereknek (VGluT1-3) az immunreaktivitását vizsgáltuk a gerincvelő felületes hátsó szarvában (Li és mtsai, 2003; Todd és mtsai, 2003, Landry és mtsai, 2004). A peptiderg nociceptív primer afferensek egy része glutamát mellett P-anyagot (SP) is felszabadít neurotransmitterként, ezért az SP kolokalizációját is vizsgáltuk a HCN2-vel.

Mindhárom vezikuláris glutamát transzporter pontszerű, terminális jelölődést mutatott a gerincvelő hátsó szarvában, ahogy azt már korábban leírták (Varoqui és mtsai, 2002). A hátsó szarv I-IIo laminájában, ahol a HCN2 immunreaktivitást kimutattuk, a VGluT2 mutatta a legerősebb immunfestődést (15. ábra b). A VGluT3 immunreaktivitás már sokkal gyengébb jelölődést adott (15. ábra c), míg a VGluT1 immunjelölés csak elszórtan volt megfigyelhető, és inkább a mélyebb laminákra korlátozódott (15. ábra a). A VGluT-ok és a HCN2 kolokalizációját vizsgálva azt találtuk, hogy a VGluT immunfestődés szinte teljesen szegregálódott a HCN2 immunreaktivitástól, és a vizsgált HCN2-immunreaktív terminálisok csupán 6%-a mutatott kolokalizációt a felületes hátsó szarvban nagyobb mennyiségben jelenlevő VGluT2-vel. A VGluT1- és VGluT3-pozitív terminálisok viszont egyáltalán nem kolokalizáltak a HCN2-immunreaktív axonvégzódésekkel.

A P-anyag immunreaktivitását vizsgálva, ahogyan korábban már mások is (Moussaoui és mtsai, 1992; Liu és mtsai, 1994; Nakaya és mtsai, 1994), mi is úgy találtuk, hogy a HCN2 immunfestődéshez hasonlóan, az SP is a gerincvelői szürkeállomány I-IIo laminájában adott intenzív immunjelölést (16. ábra b, d). A HCN2 és SP kolokalizációját tanulmányozva kimutattuk, hogy a két marker nagymértékben kolokalizált, a HCN2- és SP-pozitív terminálisok döntő többsége (92-93%-a) pozitívan festődött a másik markerre is (16. ábra b, d).



15. ábra. A HCN2 és a vezikuláris glutamáttranszporterek (VGLuT1-3) immunreaktivitásának kolokalizációja a gerincvelő felületes hátsó szarvában. A kettősen jelölt hátsó szarvról készült 1  $\mu$ m-es konfokális optikai felvételeken a piros szín a HCN2-t, a zöld a VGLuT-okat jelöli. A *b* mikrofotón látható kevert szín a HCN2 és VGLuT2 gyenge kolokalizációját mutatja, míg a VGLuT1 és VGLuT3 immunreaktivitás teljesen elkülönül a HCN2 immunjelöléstől (a, c). Skála: 20  $\mu$ m



16. ábra. A HCN2 ioncsatornák kolokalizációja P-anyaggal (SP) és kapcsolata neurokinin 1-receptor- (NK1-R) immunreaktív neuronok sejttestjeivel és dendritjeivel a gerincvelő hátsó szarvában. 1  $\mu\text{m}$ -es konfokális optikai szeletek mutatják, hogy a HCN2-immunreaktív axonterminálisok (piros) olyan NK1-R-pozitív dendritekkel és sejttestekkel (zöld) alakítanak ki szoros kapcsolatokat, amelyek perikarionjai a hátsó szarv I-es (c), vagy III-IV-es laminájában (a) találhatóak. A *b* konfokális felvételen látható sárga szín a HCN2 (piros) és SP (zöld) nagyarányú kolokalizációját reprezentálja. Az összevetített *d* jelű felvétel egy olyan hármasan jelölt metszetet mutat, amin a kolokalizáló HCN2-(piros) és SP-immunreaktív (kék) axonvégződéses lila színben jelennek meg és szoros appozíciókat hoznak létre az NK1-R-pozitív neuron (zöld) felületes laminákba felnyúló dendritjeivel. Skála: 20  $\mu\text{m}$  (a, c és d); 10  $\mu\text{m}$  (b).

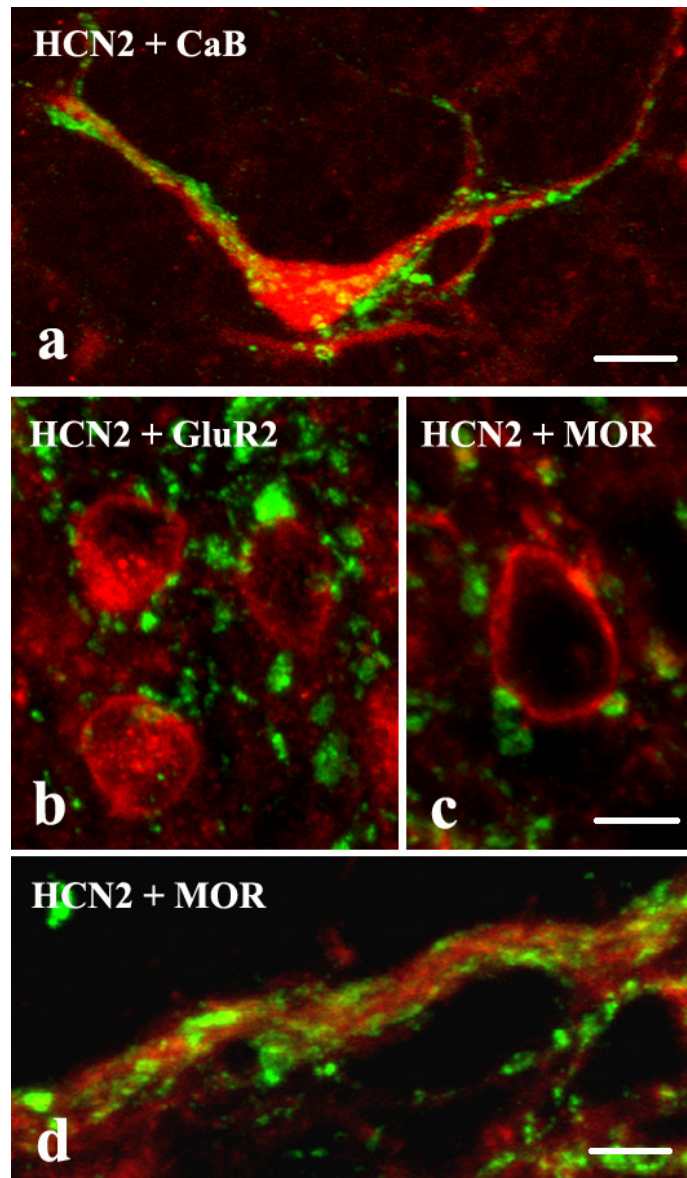
#### 4. 5. A HCN2-immunreaktív primer afferensek posztszinaptikus kapcsolatai serkentő és gátló gerincvelői interneuronokkal

Irodalmi adatok bizonyítják, hogy a peptiderg nociceptív primer afferensek serkentő és gátló interneuronokkal is kapcsolatba lépnek a gerincvelő felületes hátsó szarvában (Hayes és Carlton, 1992; Bernardi és mtsai, 1995; Wang és mtsai, 2000). Annak érdekében, hogy pontosabban körvonalazzuk, milyen jellegű neuronokkal képeznek szinaptikus kapcsolatokat a HCN2 ioncsatornákat expresszáló peptiderg nociceptív primer afferensek, kettős és hármas jelöléses immunfluoreszcens módszerrel használva megpróbáltuk legalább részlegesen jellemezni a HCN2-immunreaktív terminálisok posztszinaptikus targetjeit. A hátsó szarv I-II. lamina serkentő

neuronjainak azonosításához a P-anyag receptorát, az NK1-R-t, a calbindin D28k-t, a MOR-t és az AMPA-típusú glutamát receptor GluR2-es alegységét használtuk markerként (Antal és mtsai, 1991, Littlewood és mtsai, 1995; Kemp és mtsai, 1996; Spike és mtsai, 1998). A HCN2-pozitív axonvégzódések gátló, GABAerg interneuronokkal való kapcsolatát GAD65-eGFP transzgenikus egér (De Marchis és mtsai, 2004) gerincvelőjének hátsó szarvában tanulmányoztuk.

A korábbi megfigyeléseket megerősítve azt találtuk, hogy az NK1-R-immunreaktív neuronok sejttestjei a hátsó szarv I. és III-IV. lamináiban fordultak elő (Littlewood és mtsai, 1995). Az I-es laminában lévő NK1-R-immunreaktív neuronok dendritjei a laminán belül ágazódtak el (16. ábra. c), a mélyebb laminákban elhelyezkedő NK1-R-pozitív idegsejtek dendritjei viszont felnyúltak a hátsó szarv felületes lamináiba és ott arborizáltak (16. ábra a). A HCN2-immunreaktív terminálisok változatos kapcsolatokat alakítottak ki az NK1-R-immunreaktív neuronok sejttestjeivel és dendritjeivel. A HCN2-pozitív axonterminálisok egyrészt az I-es lamina NK1-R-pozitív sejttestjeivel és dendritjeivel hoztak létre szoros kapcsolatokat (16. ábra. c), másrészt a HCN2-immunreaktív axonkollaterálisok sorozatos appozíciókat alakítottak ki a mélyebb laminák felől érkező NK1-R-pozitív dendritekkel (16. ábra a). A HCN2 és az SP intenzív kolokalizációja ismeretében nem volt meglepő számunkra a HCN2-pozitív terminálisok és az NK1-R-immunreaktív interneuronok kapcsolata, mivel az NK1-R az SP jól ismert receptora. Ezt támasztja alá a hármasan jelölt konfokális felvétel, amely a kevert, lila színben megjelenő P-anyag (SP) tartalmú HCN2-immunreaktív terminálisok szoros appozícióit mutatja az NK1-R-t expresszáló neuronok dendritjeivel és sejttestjeivel (16. ábra d).

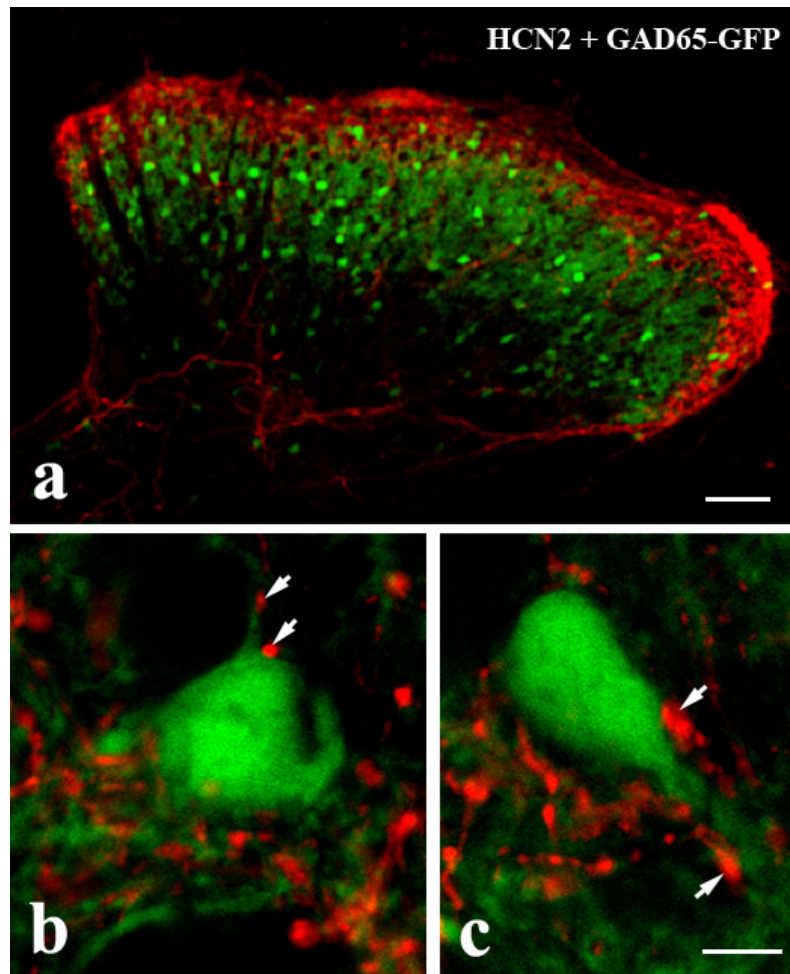
Alátámasztva a korábbi eredményeket, a calbindin D28k-(CaB) és GluR2-immunreaktív serkentő interneuronok nagy részét az I-II-es laminában mutattuk ki, a MOR-pozitív neuronokat pedig inkább a II-es laminában tudtuk megfigyelni (Antal és mtsai, 1991; Kemp és mtsai, 1996; Spike és mtsai, 1998). A HCN2-immunreaktív axonvégzódések mindhárom serkentő markert expresszáló idegsejtekkel közeli kontaktusba kerültek. A HCN2-immunreaktív terminálisok a CaB- és MOR-pozitív neuronok szómájával és dendritjeivel egyaránt szoros kapcsolatokat hoztak létre (17. ábra a, c és d). A GluR2-immunreaktív idegsejtek esetében viszont, a GluR2 szomatikus jelölődése miatt, a HCN2-pozitív axonvégzódések az immunreaktív szómákkal alakítottak ki szoros appozíciókat (17. ábra b).



17. ábra. A HCN2-immunreaktív terminálisok calbindin- (CaB, a), glutamát-receptor 2- (GluR2, b) és  $\mu$ -opioid-receptor- (MOR, c, d) pozitív interneuronok sejttestjeivel és dendritjeivel szoros kapcsolatokat alakítanak ki. Az immunreaktív axonterminálisokat zölddel, a serkentő markereket expresszáló neuronok perikarionjait és dendritjeit pirossal jelöltük. Skála: 10  $\mu$ m.

A HCN2 ioncsatornákat expresszáló nociceptív primer afferensek gátló gerincvelői interneuronokkal való kapcsolatát, GAD65-eGFP transzgenikus egér gerincvelő metszetein, GFP-vel jelölt, GAD65-öt expresszáló neuronok immunreaktivitásának segítségével vizsgáltuk. Bár számos GFP-jelölt idegsejtet találtunk a GAD65-eGFP transzgenikus egér gerincvelő felületes hátsó szarvában, viszonylag kevés mutatott szoros kapcsolatot a HCN2-pozitív axonvégzódésekkel (18).

ábra a). Az immunreaktív terminálisok elsődlegesen a GFP-pozitív neuronok sejttestjeivel és primer dendritjeivel kerültek közeli kontaktusba (18. ábra b, c).



18. ábra. A HCN2-immunreaktív terminálisok (piros) zölden fluoreszkáló fehérjét (GFP) expresszáló GABAerg interneuronokkal (zöld) lépnek kapcsolatba a glutaminsav-dekarboxiláz 65 (GAD65)-eGFP transzgenikus egér gerincvelő felületes hátsó szarvában (a). A *b* és *c* konfokális felvételen lévő nyilak a GFP-t expresszáló GABAerg neuronokkal szoros appozíciót kialakító HCN2-immunreaktív axonterminálisokat jelölik. Skála: 100  $\mu$ m (a), 10  $\mu$ m (b és c).

#### 4. 6. A HCN ioncsatornák antagonistájának (ZD7288) hatása a C és A $\delta$ primer afferensek és a hátsó szarv I-II. laminájának idegsejtjei között kialakuló szinaptikus jelátvitelre

A HCN ioncsatornák leginkább elfogadott és leggyakrabban használt szelektív antagonistájaként tartják számon a ZD7288 elnevezésű anyagot (Harris és Constanti, 1995; Beaumont és Zucker, 2000, Southan és mtsai, 2000, Pal és mtsai, 2003). Elektrofiziológiai mérésekkel kimutatták, hogy a 10  $\mu$ M-os koncentrációban alkalmazott ZD7288 teljesen blokkolja a hiperpolarizáció által kiváltott ionáramot ( $I_h$ )

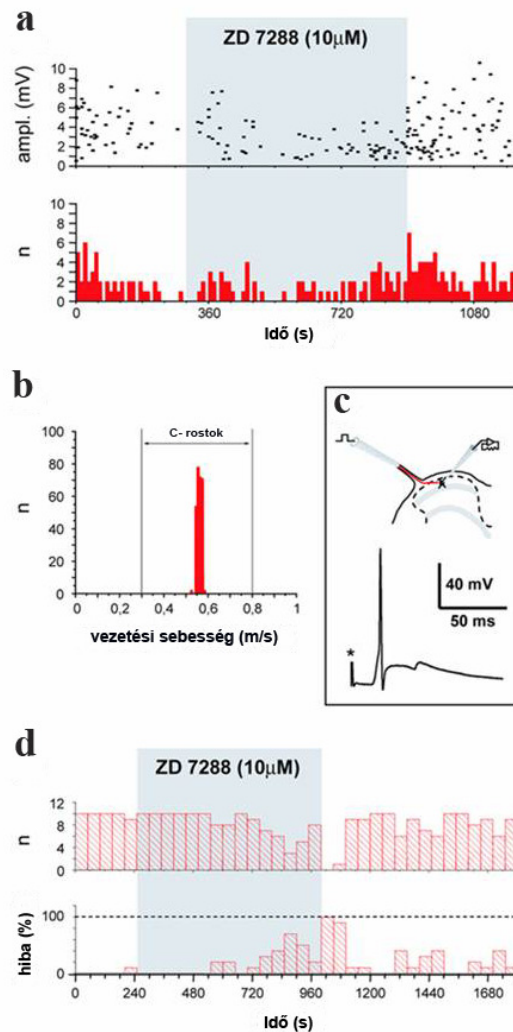
(Harris és Constanti, 1995; Pal és mtsai, 2003). Azzal a céllal, hogy tanulmányozzuk a nociceptív primer afferensek axonterminálisaiban expresszáldó HCN ioncsatornák működőképességét, ZD7288 alkalmazása mellett teszteltük a szinaptikus jelátvitel hatékonyságát a nociceptív primer afferensek és másodlagos érző neuronok között.

Teljes sejt konfigurációjú patch-clamp méréseket végeztünk 30 gerincvelői neuronon, amelyek a hátsó szarv I-II. laminájából származtak. A 30 regisztrált neuronból 8 kapott rövid látenciájú monoszinaptikus bemenetet a C és/vagy A $\delta$  primer afferensektől (19. ábra c). Elektrofiziológiai vizsgálataink eredményei ennek a nyolc idegsejtnek a tanulmányozásán alapultak. A stimulált primer afferenseket vezetési sebességük alapján azonosítottuk. C-rostnak tekintettük a 0,3–0,8 m/s vezetési sebességű primer afferenseket és A $\delta$ -nak a 3,8–8 m/s vezetési sebességű rostokat (19. ábra b). A vizsgált nyolc idegsejtből hat C rostoktól, egy A $\delta$  rostoktól kapott monoszinaptikus bemenetet, és egy neuront pedig mindkét típusú primer afferens innervált.

A regisztrált neuronok 0,5–10 mV között változó amplitúdójú spontán serkentő posztszinaptikus potenciálokat (sEPSP) mutattak. A 10  $\mu$ M koncentrációban alkalmazott ZD7288 hatására az sEPSP-k amplitúdója jelentősen visszaesett (0,5–4 mV), de az sEPSP-k száma csak kismértékű csökkenést mutatott (19. ábra a). Az antagonistá kimosását követően jelentősebb késés nélkül visszaállt az sEPSP-k kontroll értékekre jellemző frekvenciája és amplitúdója (19. ábra a).

A C és A $\delta$  rostok elektromos stimulációja a regisztrált neuronokon változó megbízhatósággal váltott ki monoszinaptikus posztszinaptikus potenciálokat. Kontroll körülmények között a C és A $\delta$  rostok stimulációja a vizsgált idegsejtek többségén nem minden esetben váltott ki serkentő posztszinaptikus potenciálokat, a szinaptikus jelátvitel átlagos hibaszázaléka  $34 \pm 10\%$ -ot ( $\pm$  SEM) mutatott. A ZD7288 alkalmazása során csökkent a szinaptikus transzmisszió megbízhatósága, és megemelkedett azoknak a stimulációknak a száma, amelyek nem váltottak ki posztszinaptikus potenciált a regisztrált neuronokon (19. ábra d). A ZD7288 alkalmazásának kezdetén (az első 250 mp-ben) a jelátvitel hibaszázaléka csak kismértékben növekedett ( $46 \pm 15,5\%$ ,  $p = 0,21$ ). Később, a szinaptikus transzmisszió megbízhatóságának csökkenésével párhuzamosan egyre magasabb értékeket ért el, és szignifikáns különbséget mutatott a kontroll értékekhez képest ( $74,7 \pm 14,5\%$ ,  $p = 0,0051$ ). Az egyik vizsgált neuron esetében azt találtuk, hogy a transzmisszió hibaszázaléka elérte a maximumot (100%) az

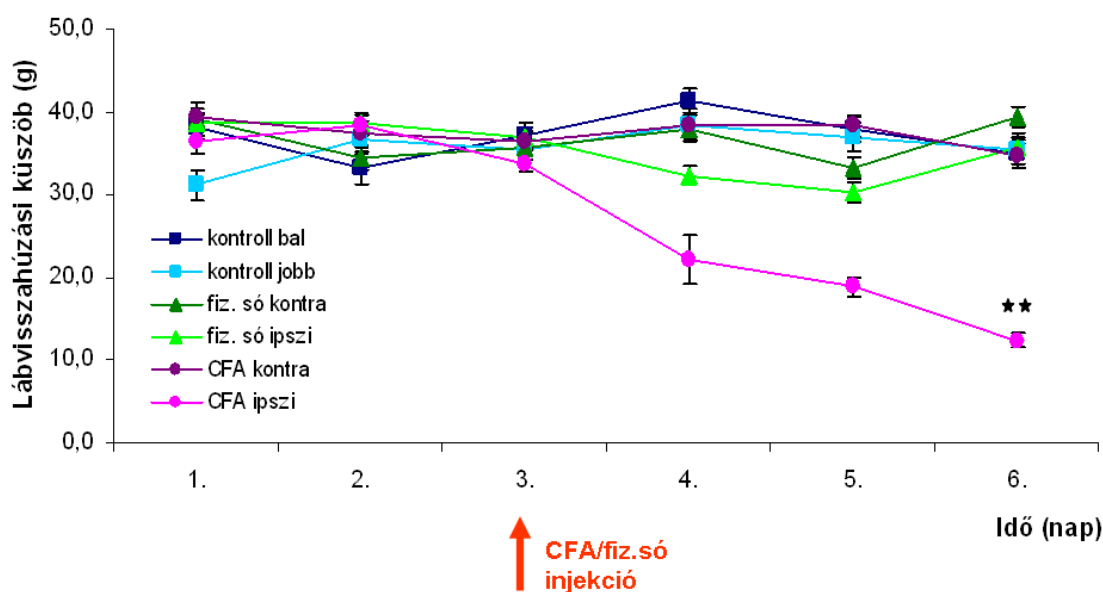
antagonista adagolásának végére (19. ábra d). A ZD7288 hatása reverzibilisnek bizonyult, az antagonisták kimosása során a jelátvitel hibaszázaléka visszatért a kontroll értékekhez ( $39,4 \pm 9,8\%$ ) (19. ábra d). A kísérletek során a posztszinaptikus potenciálok amplitúdója fokozatosan, kismértékű csökkenést mutatott, valószínűleg a szinaptikus vezikulák lassú, de folyamatos kiürülése miatt.



19. ábra. A HCN2 antagonist ZD7288 csökkenti a gerincvelői neuronok serkentő posztszinaptikus potenciáljainak (EPSP) nagyságát, és a szinaptikus jelátvitel megbízhatóságát a hátsó szarv I-II. laminájában. Az *a* diagram a C és A $\delta$  primer afferensek által ingerelt neuron spontán EPSP-inek számát és amplitúdóját mutatja, amely az antagonisták hatására mérséklődött. A *d* diagramon szereplő neuront aktiváló nociceptív afferensek átlagos vezetési sebességük alapján C rostoknak bizonyultak (*b*). A *c* ábra sematikus rajza a kísérleti modellt, és a hátsó szarvi neuronokon regisztrált monoszinaptikus akciós potenciált szemlélteti. A *d* hisztogramon látható, hogy az antagonisták alkalmazásával csökkent a monoszinaptikus akciós potenciálok száma és ezzel párhuzamosan növekedett a szinaptikus jelátvitel hibaszázaléka. A ZD7288 hatása reverzibilis volt.

#### 4. 7. A mechanikai allodynia kialakulása Freund-adjuváns által kiváltott gyulladásoos fájdalomállapotban

A teljes Freund-adjuváns (CFA) subcutan injekciójával kiváltott gyulladás az egyik leggyakrabban alkalmazott gyulladásoos fájdalomállapot modell (Iadarola és mtsai, 1988; Millan és mtsai, 1988). Kísérletünk során ebben a modellben vizsgáltuk a mechanikai allodynia kialakulását. A kontroll állatoknál és injektlás előtt a másik két állatesoportnál is, a talpra alkalmazott 35–40 g nyomóerő váltott ki lábviSSHahúzási reakciót, amit a mechanikai ingerlésre adott válaszkésztség alapértékének tekintettünk. A 20. ábra grafikonján jól látható, hogy azoknál az állatoknál, amelyek CFA injekciót kaptak, az injektlált hátsó talp lábviSSHahúzási küSHöbértéke az injektlást követően fokozatosan csökkent, és az injektlást követő harmadik napra az alapérték 35%-ára esett vissza ( $12,4 \pm 0,9$  g,  $p = 0,004$ ).



20. ábra. Mechanikai allodynia kialakulása Freund-adjuvánsal kiváltott talpgyulladás során. Mindhárom állatesoportban a lábviSSHahúzási reakcióküSHöb alapértéke 35–40 g nyomóerőnél volt. A CFA-val injektlált állatok ipszilaterális (jobb) hátsó talpának reakcióküSHöbe szignifikánsan lecsökkent ( $12,4 \pm 0,9$  g-re) az injektlást követő harmadik napra. A fiziológias sóoldattal injektlált állatok reakcióküSHöbe csak kismértékű csökkenést mutatott, és az injektlást követő harmadik napra visszaállt a kiindulási alapértékre. A piros nyíl a CFA, illetve fiziológias sóoldat beinjektlálásának időpontját jelzi. A grafikon adatai az állatok reakcióküSHöbének átlagos értékeit  $\pm$  SEM mutatják (\*\*  $p = 0,004$ ).

Abban az állatcsoportban, amelyik fiziológiás sóoldat injekciót kapott, az állatok injektált talpának lábvisszahúzási küszöbértéke az injekciót követő első és második napon valamivel (nem szignifikáns mértékben) csökkent, de az injekciót követő harmadik napra újra elérte az alapértéket (20. ábra). Irodalmi és saját adatok is azt bizonyítják, hogy CFA injekció esetén a nociceptív válaszkészség a gyulladás harmadik napján tetőzik, így a magatartási vizsgálatokat az injektálást követően három napig végeztük (Millan és mtsai, 1988; Ma és Woolf, 1996).

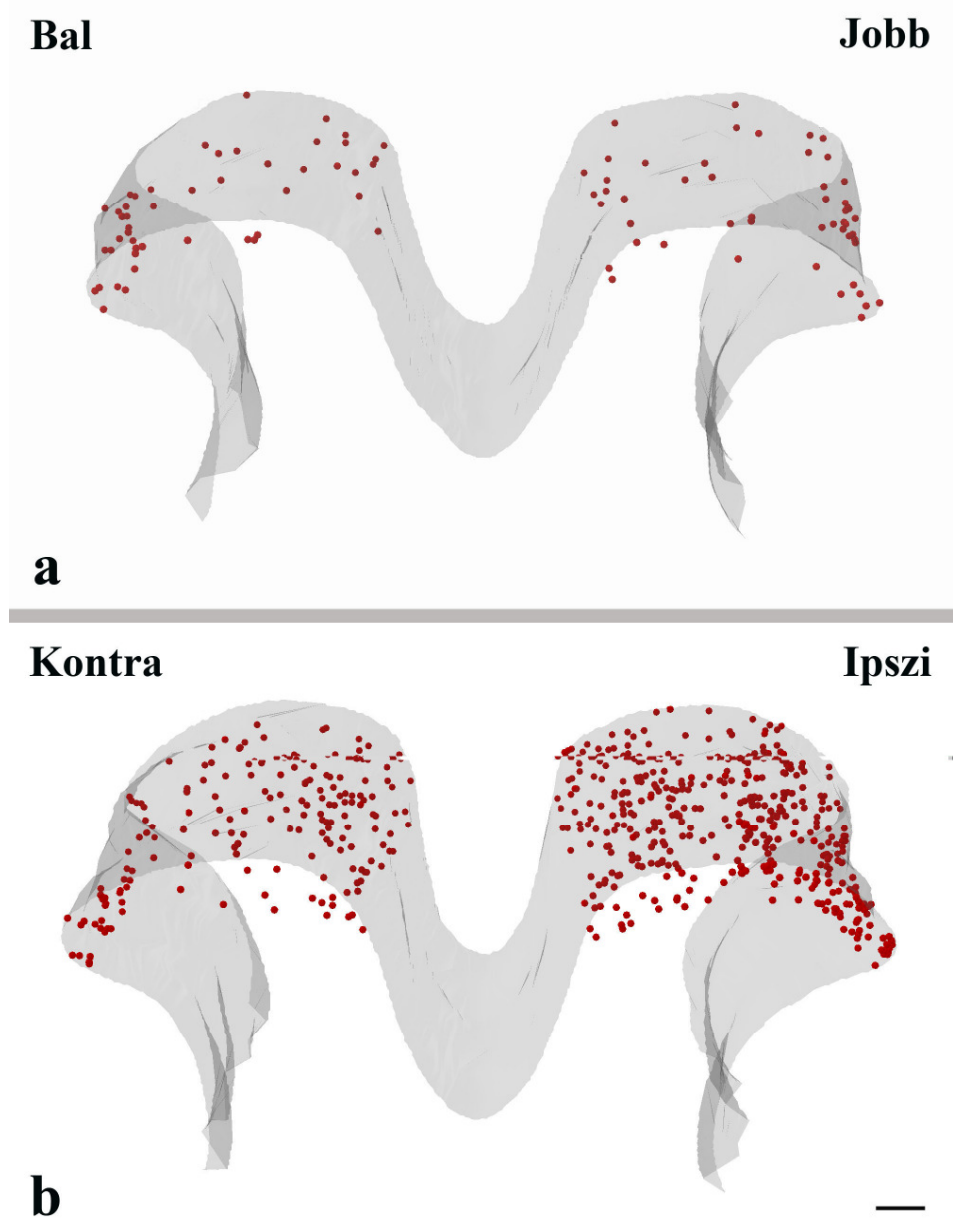
#### **4. 8. c-Fos fehérje expresszió a patkány gerincvelő felületes hátsó szarvában CFA-val indukált gyulladásos fájdalomállapotban**

A szervezetet érő szövetkárosító behatások egyik első válaszreakciója, hogy a gerincvelői hátsó szarvi neuronokban az „immediate early genes” (IEG) géncsaládhoz tartozó gének aktiválódnak. Ennek a géncsaládnak az egyik tagja a c-Fos (Morgan és Curran, 1991). A c-Fos gén egy 62 kDa tömegű magfehérjét (c-Fos fehérje) kódol, amelynek immunreaktivitását régóta használják a neuronális aktivitás indikátoraként (Hunt és mtsai, 1987, Morgan és mtsai, 1987; Sagar és mtsai, 1988). Gyulladásos modellünkben a gerincvelő hátsó szarvában lévő neuronok aktivitását a c-Fos fehérje immunreaktivitásával teszteltük.

A c-Fos-immunreaktív neuronok eloszlását a lumbális gerincvelő hátsó szarvának I-II. laminájában, a NeuroLucida Solid moduljával készített háromdimenziós rekonstrukciós ábrák mutatják, kontroll és gyulladásos körülmények között (21. ábra). A hátsó szarv felülnézeti képén jól látható, hogy a kontroll állatok hátsó szarva is mutatott egy kismértékű alapaktivitást, amit az elszórtan megjelenő c-Fos-immunreaktív sejtek jeleznek (21. ábra a). Ehhez képest, a CFA-val injektált állatok felületes hátsó szarvának L4-es szegmentumában mindkét oldalon szembetűnően megnövekedett az aktív, c-Fos-pozitív neuronok száma a hátsó szarv teljes mediolaterális kiterjedésében (21. ábra b).

A c-Fos-immunreaktív neuronok eloszlásának kvantitatív elemzése során a lumbális gerincvelő felületes hátsó szarvát mediolaterálisan három, egyenlő szélességű régióra osztottuk: mediális, intermedier és laterális régióra. Az L4-es szegmentumból vett és c-Fos-ra immunfestett 10 metszet mindegyikén, mindhárom régióban megszámoltuk a c-Fos-pozitív sejteket a kontroll és a CFA injekciót kapott állatokban. Az átlagos sejtszámokat a standard középhibával (SEM) együtt az 1. táblázatban

tüntették fel. Bár a magatartási vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy az unilaterális gyulladás csak az injektált oldalon váltott ki mechanikai allodyniát, a c-Fos immunreaktivitás a gerincvelő mindkét oldali hátsó szarvában jelentősen megemelkedett.



21. ábra. c-Fos immunreaktivitás a lumbális gerincvelő L4-es szegmentumából származó metszetek felületes hátsó szarvában kontroll (a) és CFA injekciót kapott állatokban (b). A kontroll állatok felületes hátsó szarvához képest, ahol kevés c-Fos-pozitív neuront találtunk (a), a CFA injekciót kapott állatok hátsó szarvában mindkét oldalon többszörösére emelkedett a c-Fos-immunreaktív neuronok száma (b). Skála: 100  $\mu$ m.

A c-Fos-pozitív sejtek számában bekövetkezett változást a vizsgált régiókban és a felületes hátsó szarv teljes mediolaterális kiterjedésében vizsgálva azt találtuk, hogy a c-Fos-pozitív sejtek száma a CFA injekcióval azonos oldali felületes hátsó szarv mindhárom régiójában közel azonos mértékben, szignifikánsan nőtt (1. táblázat). Érdekes módon a CFA injekcióhoz képest ellenoldali felületes hátsó szarvban is szignifikánsnak bizonyult a c-Fos-immunreaktív sejtek számbeli növekedése, bár jelentősen kisebb mértékű emelkedést találtunk itt, mint a CFA injekcióval azonos oldali gerincvelőfélben (1. táblázat).

**1. táblázat. A c-Fos-immunreaktív sejtek száma a felületes hátsó szarv három régiójában és teljes mediolaterális kiterjedésében a kontroll és a CFA injekciót kapott patkányok lumbális gerincvelőjének L4 szegmentumában.**

A gerincvelő felületes hátsó szarvának régiói	c-Fos-immunreaktív sejtek száma (átlag $\pm$ SEM) (n = 30)		
	Kontroll állatok	CFA injekciót kapott állatok	
		injekcióhoz képest ipszilaterális oldal	injekcióhoz képest kontralaterális oldal
Mediális	23 $\pm$ 2	109 $\pm$ 14	75 $\pm$ 6
Intermedier	19 $\pm$ 1	111 $\pm$ 8	54 $\pm$ 6
Laterális	25 $\pm$ 4	101 $\pm$ 21	78 $\pm$ 17
Teljes M-L kiterjedés	67 $\pm$ 2	322 $\pm$ 40	207 $\pm$ 17

A változások mind az azonos, mind az ellenoldali felületes hátsó szarvban, mind az egyes régiókra, mind a hátsó szarv teljes mediolaterális kiterjedésére vonatkoztatva magasan szignifikánsnak bizonyultak (\*\*\*)  $p = 0,00000057$  (ipszilaterális);  $p = 0,00013$  (kontralaterális)). Összehasonlítva a c-Fos-pozitív sejtek számát a CFA injekciót kapott állatok injekcióval azonos és ellentétes oldali hátsó szarvában, a laterális régió kivételével a sejtszámok jelentősen különböztek és jóval magasabb értékeket mutattak a CFA injekcióval azonos oldali hátsó szarvban (1. táblázat).

#### **4. 9. A HCN2-csatornafehérje kifejeződése a lumbális gerincvelő hátsó szarvában Freund-adjuvánsal kiváltott gyulladással járó fájdalomállapotban**

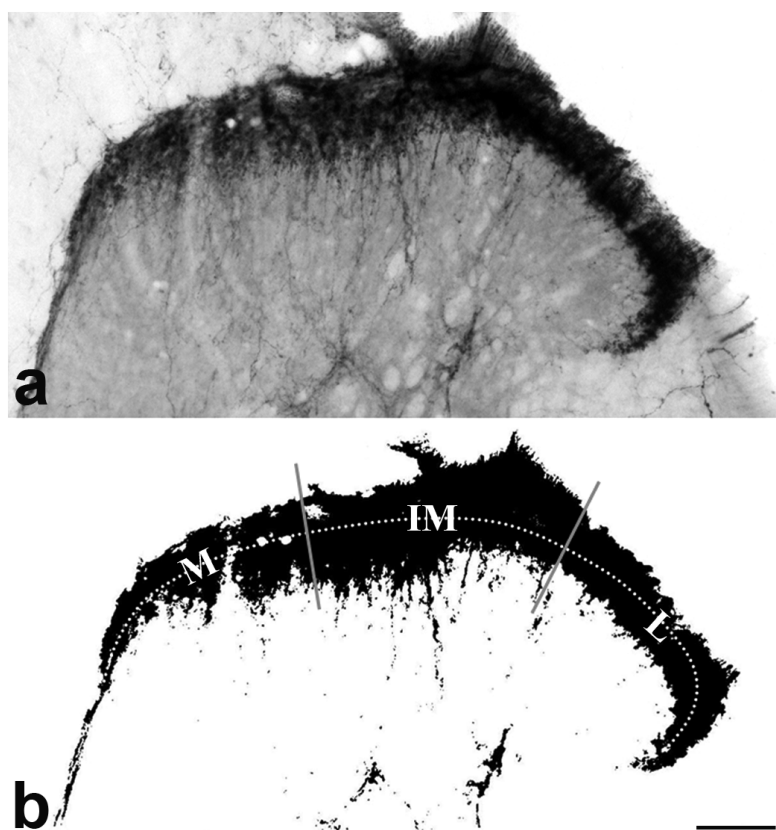
Annak vizsgálatára, hogyan változik a HCN2-csatornafehérje kifejeződése a gerincvelő L4-es szegmentumának felületes hátsó szarvában, Freund-adjuvánsnak a jobb oldali talp bőre alá való injektálását követően kialakuló gyulladással járó fájdalomállapotban: 1) egyszeres immunhisztokémiai festést követően mértük a HCN2-immunreaktív terület nagyságát, 2) kettős immunhisztokémiai festéseket követően meghatároztuk a HCN2- és SP-immunreaktív axonterminálisok számát és a két marker közötti kolokalizációt, illetve 3) Western blot módszer segítségével mértük a HCN2 fehérje mennyiségét. A mérési eredményeket összehasonlítottuk a kezeletlen állatokban mért hasonló adatokkal.

##### **4. 9. 1. A HCN2-immunreaktív terület nagysága a gerincvelő hátsó szarvában Freund-adjuváns által kiváltott gyulladással járó fájdalomállapotban**

A HCN2-immunreaktív terület nagyságát, illetve annak esetleges változását gyulladással járó fájdalommodellünkben kvantitatív módon vizsgáltuk, olyan metszetek fénymikroszkópos felvételein, amelyeken a HCN2-t DAB alapú immunperoxidáz módszerrel tettük láthatóvá (22. ábra a).

A kvantitatív elemzést Image J szoftver segítségével végeztük úgy, hogy az L4-es szegmentumból készült 10 metszet felvételein először teljesen kiszűrtük az immunjelölésből adódó minimális háttérfestődést, majd megmértük a gerincvelő felületes hátsó szarvának HCN2-immunfestett területét a hátsó szarv teljes mediolaterális kiterjedésében és a fentebb említett mediális, intermedier és laterális régióiban (22. ábra b).

A felületes hátsó szarv HCN2-immunreaktív területének kiterjedését vizsgálva, a kontroll és CFA injekciót kapott állatokból készült metszeteken nem találtunk értékelhető különbséget az immunfestett területek nagyságát illetően. Az immunreaktív területek nagyságának számszerű értékeit a mediális, intermedier és laterális régióban, illetve a hátsó szarv teljes mediolaterális kiterjedésében a 2. táblázatban foglaltuk össze.



22. ábra. HCN2 immunfestődés a CFA injekciót kapott állat ipszilaterális gerincvelőjének hátsó szarvában valódi megjelenésében (a) és háttérszűrést követően (b). A *b* képhez hasonló felvételeken végeztük a HCN2-immunreaktív gerincvelői szürkeállomány területméréseit régióként (M: mediális, IM: intermedier és L: laterális régió), és a hátsó szarv teljes mediolaterális kiterjedésében. Skála: 100  $\mu\text{m}$ .

2. táblázat. A HCN2-immunreaktív területek nagysága a felületes hátsó szarv régióiban és teljes mediolaterális kiterjedésében, a kontroll és CFA injekciót kapott állatok L4-es gerincvelői szegmentumában.

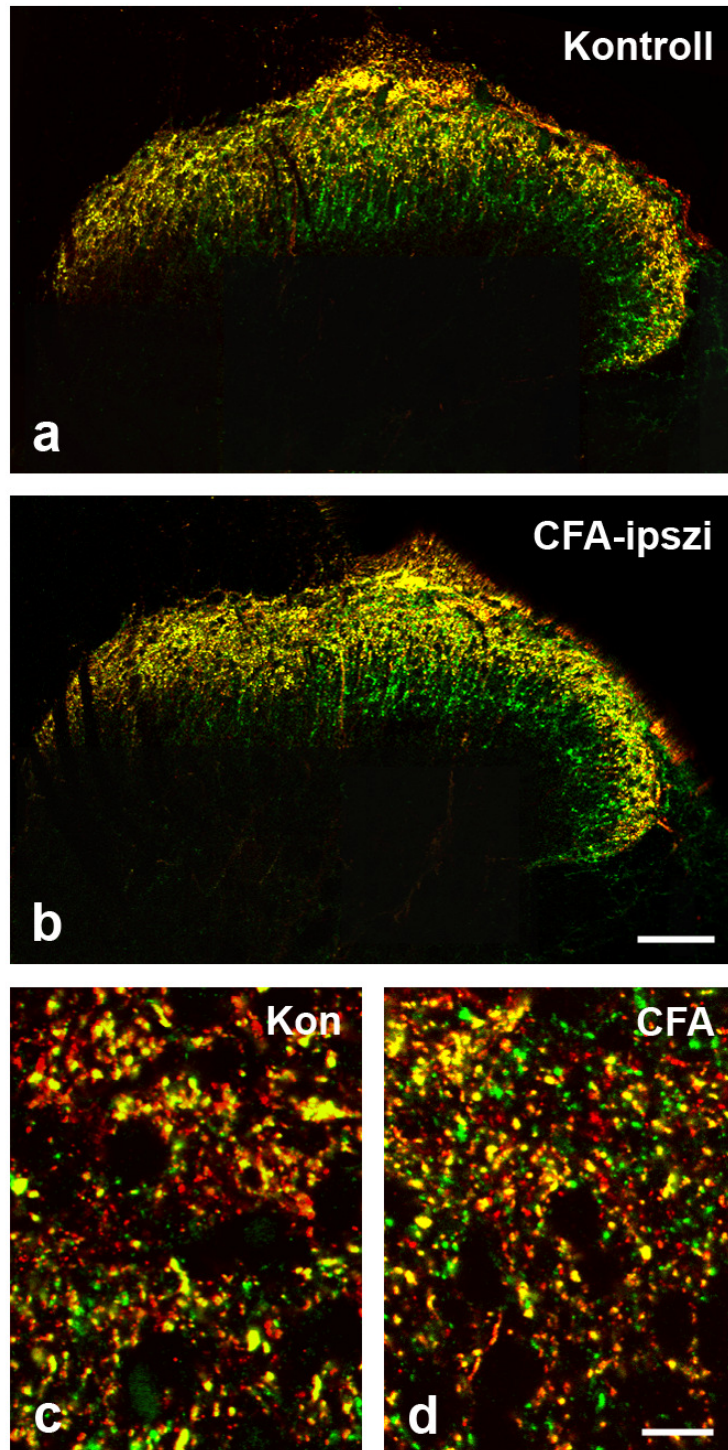
A gerincvelő felületes hátsó szarvának régiói	HCN2-immunreaktív terület nagysága ( $\mu\text{m}^2$ ) (átlag $\pm$ SEM) (n = 30)		
	Kontroll állatok	CFA injekciót kapott állatok	
		injekcióhoz képest ipszilaterális oldal	injekcióhoz képest kontralaterális oldal
Mediális	22170 $\pm$ 260	21409 $\pm$ 546	21377 $\pm$ 656
Intermedier	20928 $\pm$ 253	21517 $\pm$ 343	21110 $\pm$ 292
Laterális	11213 $\pm$ 257	11246 $\pm$ 294	11013 $\pm$ 267
Teljes M-L kiterjedés	54311 $\pm$ 489	54172 $\pm$ 871	53500 $\pm$ 745

#### **4. 9. 2. A HCN2- és SP-immunreaktív axonterminálisok száma, illetve a HCN2 és SP immunreaktivitás kolokalizációja a lumbális gerincvelő felületes hátsó szarvában CFA-val indukált gyulladásos fájdalomállapotban**

Mivel kontroll állatokban úgy találtuk, hogy a HCN2-immunreaktív terminálisok döntő része P-anyagot is tartalmaz, ezért kettős jelöléses immunfluoreszcens metszeteken a kontroll állatok mellett (23. ábra a), a CFA injekciót kapott állatokban (23. ábra b) is vizsgáltuk a gerincvelői hátsó szarv HCN2 és SP immunreaktivitását, illetve a két marker kolokalizációját.

A kvantitatív analízis során a gerincvelői felületes hátsó szarv fentebb említett régióiban, az Anyagok és Módszerek fejezetben leírt módon, az immunfestett metszetekről készült 1  $\mu\text{m}$  vastag konfokális optikai szelet felvételeire standard négyzethálót helyeztünk, és a négyzetháló oldalai mentén számoltuk meg a HCN2- és SP-immunreaktív terminálisokat. A 23. ábra *c* és *d* jelű részeihez hasonló konfokális optikai szeletek felvételein végeztük az immunreaktív terminálisok mennyiségi elemzését.

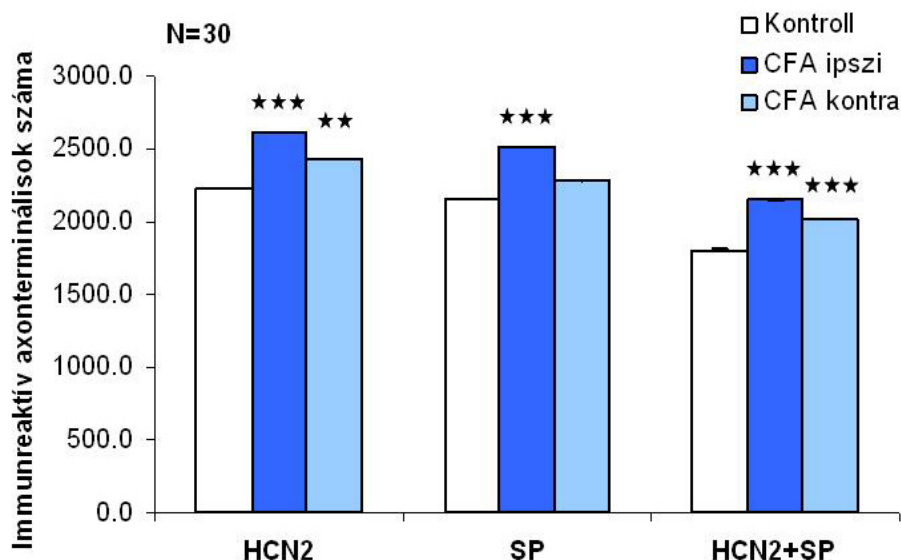
A HCN2-immunreaktív axonterminálisok kvantitatív vizsgálata azt mutatta, hogy a HCN2-pozitív terminálisok száma a felületes hátsó szarv laterális régiójának kivételével, ahol nem találtunk jelentős változást, szignifikánsan emelkedett a CFA injekcióval azonos oldali gerincvelőfélben (3. táblázat és 24. ábra, \*\*\*  $p = 0,0000036$ ). A HCN2-immunreaktív axonterminálisok száma jelentősen nőtt a CFA injekcióhoz képest ellenoldali felületes hátsó szarv intermedier és mediális régiójában is (\*\*  $p = 0,0059$ ). Fontos megjegyezni, hogy az immunreaktív terminálisok számának növekedése a CFA injekcióval azonos oldali gerincvelőfélben mindig lényegesen meghaladta az ellenoldalon mért növekedést (3. táblázat és 24. ábra).



23. ábra. HCN2-re (piros) és SP-re (zöld) egyaránt festődő, kontroll (a, c) és CFA injekciót kapott állatokból (b, d) származó gerincvelői metszetek konfokális felvételei kisebb (a, b) és nagyobb nagyítással (c, d). Az 1  $\mu\text{m}$  vastag konfokális optikai felvételeken látható kevert, sárga szín a kettősen festődő axonterminálisokat jelöli. Skála: 100  $\mu\text{m}$  (a és b), 20  $\mu\text{m}$  (c és d).

3. táblázat. A HCN2-immunreaktív terminálisok száma a hátsó szarv I-II. laminájának régióiban és teljes mediolaterális kiterjedésében, kontroll és CFA injekciót kapott patkányok L4-es gerincvelői szegmentumában.

A gerincvelő felületes hátsó szarvának régiói	HCN2-immunreaktív terminálisok száma (átlag ± SEM) (n = 30)		
	Kontroll állatok	CFA injekciót kapott állatok	
		injekcióhoz képest ipsilaterális oldal	injekcióhoz képest kontralaterális oldal
Mediális	870 ± 3	1019 ± 3	957 ± 3
Intermediér	699 ± 2	887 ± 3	774 ± 2
Laterális	658 ± 3	708 ± 2	701 ± 2
Teljes M-L kiterjedés	2227 ± 3	2614 ± 3	2432 ± 3



24. ábra. A HCN2-, az SP-immunreaktív és a kettősen festődő axonterminálisok száma a felületes hátsó szarv teljes mediolaterális kiterjedésében, kontroll és CFA-val injektált patkányok L4-es gerincvelői szegmentumában. A HCN2- és az SP-pozitív terminálisok száma hasonló mértékben, szignifikánsan emelkedett a CFA injekcióval ipsilaterális hátsó szarvban, és kisebb mértékű növekedést a kontralaterális oldalon is találtunk. A kettősen festődő terminálisok száma szintén jelentős emelkedést mutatott, mind az ipszi-, mind a kontralaterális hátsó szarv I-II. laminájában, a kontroll értékekhez képest. Az adatokat átlagértékekben ± SEM fejeztük ki (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

Az SP-immunreaktív axonterminálisok kvantitatív analízise során azt találtuk, hogy a CFA injekcióval azonos oldali felületes hátsó szarv mindhárom régiójában és teljes mediolaterális kiterjedésében is szignifikánsan növekedett az immunreaktív

terminálisok száma, különös tekintettel az intermedier régióra, ahol a szignifikanciaszint a legmagasabbnak bizonyult (4. táblázat és 24. ábra, \*\*\*  $p = 0,0000005$ ). A SP-immunreaktív terminálisok számának emelkedése ugyanúgy az intermedier régióban volt a legnagyobb, mint a HCN2-pozitív terminálisoké, és ahhoz hasonló mértéket is mutatott. Ellentétben a CFA injekcióhoz képest ipszilaterális hátsó szarvban regisztrált növekedéssel, a kontralaterális felületes hátsó szarv egyik régiójában sem találtunk szignifikáns változást az SP-immunreaktív terminálisok számában (4. táblázat és 24. ábra).

**4. táblázat. Az SP-immunreaktív terminálisok száma a felületes hátsó szarv régióiban és teljes mediolaterális kiterjedésében, kontroll és CFA injekciót kapott patkányok L4-es gerincvelői szegmentumában.**

A gerincvelő felületes hátsó szarvának régiói	SP-immunreaktív terminálisok száma (átlag $\pm$ SEM) (n = 30)		
	Kontroll állatok	CFA injekciót kapott állatok	
		injekcióhoz képest ipszilaterális oldal	injekcióhoz képest kontralaterális oldal
Mediális	805 $\pm$ 3	919 $\pm$ 3	855 $\pm$ 3
Intermedier	687 $\pm$ 2	858 $\pm$ 3	720 $\pm$ 2
Laterális	663 $\pm$ 2	734 $\pm$ 2	704 $\pm$ 2
Teljes M-L kiterjedés	2155 $\pm$ 3	2511 $\pm$ 3	2279 $\pm$ 3

A HCN2-re és SP-re egyaránt festődő terminálisok számának alakulását vizsgálva a gyulladási fájdalomállapotban azt figyeltük meg, hogy a CFA injekciót kapott állatok injekcióval azonos oldali felületes hátsó szarvában a laterális régió kivételével, mind az intermedier, mind a mediális régióban, és a hátsó szarv teljes mediolaterális kiterjedésében is jelentősen emelkedett azoknak a terminálisoknak a száma, amelyek pozitívan festődtek mind HCN2-re, mind SP-re (5. táblázat és 24. ábra, \*\*\*  $p = 0,00000036$ ). A kettősen festődő axonterminálisok számában a CFA injekcióval ellenoldali felületes hátsó szarvban hasonló, de kisebb mértékű növekedést találtunk, mint az azonos oldaliban. A laterális régiót kivéve itt is mindegyik régióban szignifikáns volt a növekedés, azzal a különbséggel, hogy az emelkedés alacsonyabb szintű szignifikanciát mutatott a kontroll értékekhez képest (5. táblázat és 24. ábra, \*\*\*  $p = 0,00079$ ).

A kettősen festődő terminálisok számát összevetve a HCN2, illetve az SP immunreaktivitást mutató terminálisok összes számával azt találtuk, hogy a HCN2 és SP közötti kolokalizáció mértéke szinte alig változott a CFA injekciót kapott állatok ipszi- (82–86%) és kontralaterális felületes hátsó szarvának teljes mediolaterális kiterjedésében (83–88%), a kontroll állatok felületes hátsó szarvában számolt értékekhez képest (81–84%).

**5. táblázat. HCN2 és SP immunreaktivitást egyaránt mutató terminálisok száma a hátsó szarv I-II. laminájának régióiban és teljes mediolaterális kiterjedésében, kontroll és CFA injekciót kapott állatok L4-es gerincvelői szegmentumában.**

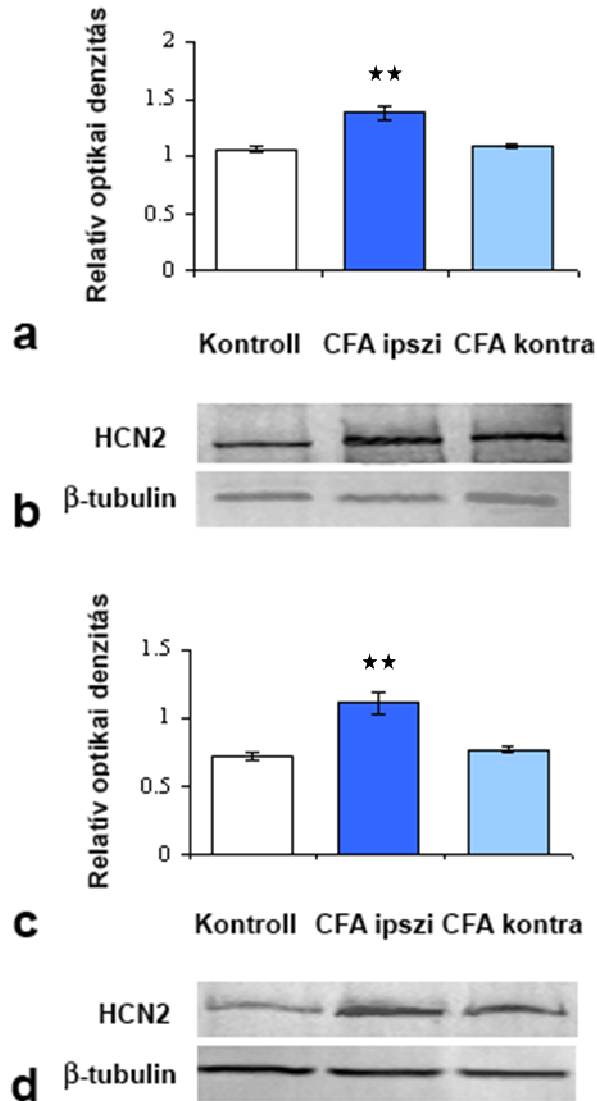
A gerincvelő felületes hátsó szarvának régiói	HCN2-re és SP-re egyaránt pozitív immunfestődést mutató axonterminálisok száma (átlag ± SEM) (n = 30)		
	Kontroll állatok	CFA injekciót kapott állatok	
		injekcióhoz képest ipszilaterális oldal	injekcióhoz képest kontralaterális oldal
Mediális	696 ± 2	826 ± 2	774 ± 3
Intermedier	572 ± 2	735 ± 3	647 ± 2
Laterális	538 ± 2	589 ± 2	590 ± 2
Teljes M-L kiterjedés	1806 ± 2	2150 ± 2	2011 ± 2

#### **4. 9. 3. A HCN2 fehérje mennyiségének változása a lumbális gerincvelő hátsó szarvában CFA-val kiváltott gyulladásos fájdalomállapotban**

Annak érdekében, hogy megerősítsük immunhisztokémiai vizsgálataink eredményeit, és megvizsgáljuk a HCN2 fehérjék mennyiségi alakulását a CFA injekció által kiváltott gyulladásos fájdalomállapotban, Western blot elemzést végeztünk kontroll és CFA injekciót kapott állatok L4-es gerincvelői szegmentumának hátsó szarvából származó minták teljes lizátumán, illetve membránfrakcióján.

A Western blot sávok denzitometriás feldolgozása során a kapott adatokat a belső, loading kontroll ( $\beta$ -tubulin) optikai denzitásához normalizáltuk (25. ábra b és d). A relatív optikai denzitás számszerű adatait átlagértékekben  $\pm$  SEM fejeztük ki, és a 25. ábra oszlopdiagramjain tüntettük fel. Úgy találtuk, hogy a CFA injekcióval azonos oldali hátsó szarvban a HCN2 fehérje relatív mennyisége szignifikánsan emelkedett, mind a teljes lizátumból (25. ábra a, \*\* p = 0,008), mind a membránfrakcióból készült

mintákban (25. ábra c, \*\*  $p = 0,006$ ), a kontroll állatokban mért értékekhez képest. A CFA injekcióval ellenoldali hátsó szarvban csekély mértékben növekedett a HCN2 fehérje relatív mennyisége a kontroll állatok értékeihez viszonyítva (25. ábra a, c).



25. ábra. A HCN2 fehérje relatív mennyisége a gerincvelő hátsó szarvában kontroll és CFA injekciót kapott állatok L4-es gerincvelői szegmentumában. Az injekcióhoz képest ipsilaterális hátsó szarvban a HCN2 fehérje relatív mennyisége szignifikánsan emelkedett, mind a teljes lizátumból (a, b), mind a membránfrakcióból származó mintákban (c, d), a kontroll értékekhez viszonyítva. A kontralaterális hátsó szarvban viszont szinte alig növekedett a HCN2 fehérje relatív mennyisége. A teljes extraktumból és a membránfrakcióból származó adatokat a belső kontroll ( $\beta$ -tubulin) értékeihez normalizáltuk és átlagértékekben  $\pm$  SEM tüntettük fel (\*\*  $p < 0,01$ ).

## 5. MEGBESZÉLÉS

### 5. 1. A HCN ioncsatornák 2-es izoformájának (HCN2) expressziója a gerincvelő felületes hátsó szarvában végződő peptiderg nociceptív primer afferensek centrális axonvégződéseiben

A hiperpolarizáció által aktiválódó ionáramot ( $I_h$ ) és a HCN ioncsatorna fehérjét korábban már többen kimutatták a gerincvelői dúcok neuronjainak sejttestjeiben és perifériás nyúlványaiban (Mayer és Westbrook, 1983; Scroggs és mtsai, 1994; Grafe és mtsai, 1997; Chaplan és mtsai, 2003; és Yao és mtsai, 2003). A közelmúltban Chaplan és mtsai (2003) leírták, hogy a patkány gerincvelői dúcaiban a HCN1, 2 és 3 izoforma expresszálódik immunhisztokémiailag kimutatható mennyiségben. Az egér gerincvelői dúcaiban is hasonló megoszlást találtak, azzal a különbséggel, hogy a HCN3 nem volt detektálható mennyiségben jelen a dúcsejtben (Moosmang és mtsai, 1999). In situ hibridizációs vizsgálatokkal bizonyították, hogy a HCN izoformák közül a HCN1 és HCN2 expresszálódik legnagyobb mértékben az egér különböző méretű dúcsejtjeiben. Az izoformák eloszlását vizsgálva azt találták, hogy a HCN1 mRNS-e minden nagy és közepes átmérőjű dúcsejtben és a kis átmérőjű dúcsejt 80%-ában kifejeződik. A HCN2 mRNS-e kisebb mennyiségben expresszálódott, a nagy és közepes átmérőjű dúcsejt 80%-ában, illetve a kis átmérőjű sejtek 60%-ában volt detektálható (Moosmang és mtsai, 2001).

Bár a HCN ioncsatornák expressziója az elsődleges érzőneuronok sejttestjein és perifériás axonjain egyértelműen bizonyított, az irodalomban nem találtunk semmilyen adatot arra vonatkozóan, hogy a HCN ioncsatorna fehérjék expresszálódnak-e az elsődleges érzőneuronok gerincvelői hátsó szarvban végződő centrális axonterminálisaiban is. Vizsgálataink során elsőként mutattuk ki, hogy a HCN ioncsatorna fehérjék közül a 2-es izoformát (HCN2) az elsődleges érzőneuronok egy csoportja centrális axonvégződéseiben is kifejezi. Habár in situ hibridizációs és immunhisztokémiai vizsgálatok is azt igazolták, hogy patkányban a HCN2 szinte minden gerincvelői dúcsejtben expresszálódik (Chaplan és mtsai, 2003), mi úgy találtuk, hogy HCN2-immunreaktív axonvégzések kizárólag a gerincvelő hátsó szarvának felületes, I-IIo lamináiban mutathatók ki. A HCN2 immunreaktivitásnak ez a korlátozott lamináris megoszlása a gerincvelő hátsó szarvában azt feltételezi, hogy a különféle gerincvelői dúcsejt különböző mértékben transzportálják a HCN2 fehérjét a centrális axonterminálisaikba.

A HCN2-immunreaktív axonterminálisok megoszlása, illetve intenzív kolokalizációja CGRP-vel és szegregációja az IB4 kötődéstől a gerincvelő felületes hátsó szarvában azt jelzi, hogy a HCN2 fehérje centrális transzportja és gerincvelői expressziója a peptiderg C és A $\delta$  típusú nociceptív primer afferensekben a legerőteljesebb, amelyek a hátsó szarv I-IIo lamináiban végződnek (Wall és Melzack, 1989). Nem zárható ki az sem, hogy a gerincvelői hátsó szarv mélyebb lamináiban végződő nem peptiderg típusú nociceptív és nem nociceptív A $\beta$  és A $\alpha$  primer afferensek (Wall és Melzack, 1989) is szállítják a HCN2-t centrális axonvégződéseikbe. De ha van is ilyen transzport az A $\beta$  és A $\alpha$  primer afferensekben, az olyan kismértékű lehet csupán, hogy a transzportálódó fehérje immunhisztokémiai módszerekkel nem mutatható ki.

Fehérjék eltérő mértékű transzportja az elsődleges érző neuronok sejttestjeiből a centrális és a perifériás terminálisok felé jól ismert jelenség. A sejttestből az axonterminálisok felé transzportálódó fehérjék általában mindkét irányba szállítódnak, de vannak olyanok is, amelyek csak egyirányba, vagy a perifériás, vagy a centrális axonvégződésekre transzportálódnak. A neurokinin1-receptor (NK1-R) például nagy mennyiségben expresszálódik számos gerincvelői dúcsejtben, és azok perifériás axonterminálisába szállítódva fontos szerepet játszik a szenzoros idegvégződések ingerelhetőségében és szenzitizációjában (Lecci és mtsai, 2000; Carlton és Coggeshall, 2002). A gerincvelői dúcsejtek egyike sem transzportálja az NK1-R-t centrális axonvégződésébe olyan mértékben, hogy az kimutatható lenne a gerincvelő hátsó szarvában. Ennek a szelektív axontranszport-mechanizmusnak a molekuláris alapjai, amely lehetővé teszi, hogy bizonyos fehérjék a perikarionokból elsődlegesen vagy kizárólag csak a centrális, vagy csak a perifériás axonterminálisokba szállítódjanak, még nem tisztázottak. Mindamellert valószínű, hogy a HCN2 fehérje centrális transzportjáért is ez a jelenleg még ismeretlen szelektív axontranszport tehető felelőssé. Lehetséges, hogy a HCN2 fehérje centrális transzportját irányító molekuláris apparátussal csak a peptiderg C és A $\delta$  primer afferensek rendelkeznek, a többi elsődleges érzőneuronból hiányzik ez a molekuláris mechanizmus.

## **5. 2. A HCN ioncsatornák lehetséges szerepe a peptiderg nociceptív primer afferensek gerincvelői axonterminálisáiban**

Irodalmi adatok alapján jól ismert, hogy a HCN ioncsatornákhöz kötődő cAMP vagy cGMP a koncentráció függvényében depolarizáltabb feszültségek felé tolja a

hiperpolarizáció által aktiválódó ionáram ( $I_h$ ) aktivációs görbáját (Pape, 1996; Robinson és Siegelbaum, 2003). Azok a receptorok, beleértve a preszinaptikus axonvégződéseken expresszáldó receptorokat, amelyek az adenilát-cikláshoz pozitívan vagy negatívan kapcsolódnak,  $\pm 20$  mV-tal is módosíthatják az ioncsatornák feszültségfüggő kapuzását, amely jelentősen modulálhatja a szinaptikus jelátvitel erősségét (Beaumont és Zucker, 2000; Müller és mtsai, 2003). Az adenilát-cikláz-cAMP rendszerrel kapcsolatban lévő preszinaptikus receptormechanizmusok a C és A $\delta$  peptiderg nociceptív primer afferensek gerincvelői axonterminálisaiban is kölcsönhatásba léphetnek a HCN ioncsatornákkal. Azt is kimutatták, hogy a gerincvelő hátsó szarvának I-II. laminájában végződő primer afferens axonterminálisok sokféle preszinaptikus neurotransmitter-receptort expresszálnak, beleértve a metabotróp glutamát-receptorok II-es és III-as csoportjának tagjait (Carlton és mtsai, 2001), az opioid- (Abbadie és mtsai, 2001) és a GABA<sub>B</sub>-receptorokat (Yang és mtsai, 2001). Ezen receptorok aktiválódása az adenilát-cikláz gátlásán keresztül a cAMP szintjének csökkenését eredményezi. Tehát az mGluR, opioid- vagy GABA<sub>B</sub>-receptorok aktiválódásának hatására olyan mértékben lecsökkenhet az  $I_h$  az axonterminálisokban, hogy jelentős mértékben hiperpolarizálódnak (Przewlocki és Przewlocki, 2001; Krieger és El Manira, 2002), és ezáltal modulálhatják a szinaptikus jelátvitelt a nociceptív primer afferensek és a másodlagos érzőneuronok között.

Nemrég azt is leírták, hogy a gerincvelői dúcsejtek is rendelkeznek spontán aktivitással és ritmuskeltő ionáramokkal ( $I_h$ ) (Mayer és Westbrook, 1983; Scroggs és mtsai, 1994; Grafe és mtsai, 1997). Bár a gerincvelői dúcsejtek nem mutatnak spontán oszcillációt, a HCN ioncsatornák által közvetített „inward” ionáramok ( $I_h$ ) olyan ismétlődő tüzeléseket indukálhatnak a dúcsejtekben, amelyeket ektopikus kisüléseknek neveznek (Amir és Devor, 1997). Úgy gondolják, hogy a dúcsejtekben kialakuló ektopikus aktivitás a gerincvelőbe jutva lényeges szerepet játszhat a neuropátiás fájdalom kialakulásában és fenntartásában (Han és mtsai, 2000, Chaplan és mtsai, 2003).

Azt is kimutatták, hogy az ektopikus aktivitással rendelkező gerincvelői dúcsejtek többsége átmenetileg depolarizálódik, ha a szomszédos, hasonló tulajdonságokat mutató dúcsejtek axonjait ismétlődő stimuláció éri (Devor és Wall, 1990). Ennek a révén a gerincvelői dúcokban a dúcsejtek között zajló ún. keresztingerlés során megnövekszik az idegsejtek küszöbalatti ingerekre mutatott

ingerelhetősége (Amir és Devor, 1996). A keresztdepolarizált neuronok megnövekedett ingerlékenységét okozhatja egyrészt az aktivitás által kiváltott extracelluláris  $K^+$ -szint emelkedése, ami az  $I_h$  felerősítésén keresztül növeli az idegsejtek ingerelhetőségét (Robinson és Siegelbaum, 2003). Másrészt, ingerületátvivő anyagok, például P-anyag, vagy glutamát szabadulhatnak fel a stimulált neuronokból, amelyek specifikus receptor mechanizmusok aktiválása révén depolarizálhatják a szomszédos idegsejteket (Amir és Devor, 1996). Mindkét mechanizmus működhet a gerincvelő felületes hátsó szarvában is, ahol a spontán aktivitást mutató, HCN2-t expresszáló nociceptív primer afferensek axonvégződéseinek aktiválódása kiválthatja az extracelluláris  $K^+$ -szint emelkedését, és/vagy a neurotranszmitterek nem szinaptikus úton történő felszabadulását. Következésképpen a spontán aktivitást mutató primer afferensek növelhetik a többi, HCN2-t kifejező primer afferens depolarizációját és ingerelhetőségét, és ezáltal jelentősen befolyásolhatják a gerincvelő felületes hátsó szarvában működő ideghálózatok alapaktivitását.

### **5. 3. A HCN ioncsatornák 2-es izoformája (HCN2) és a vezikuláris glutamát transzporterek (VGluT) immunreaktivitásának szegregációja a gerincvelő hátsó szarvában**

A glutamát az egyik legelterjedtebb neurotranszmitter az idegrendszerben, amely a szenzoros ingerületátvitel során minden primer afferensből felszabadulhat, beleértve a nociceptív C és  $A\delta$  afferenseket (Broman és mtsai, 1993, Levin és mtsai, 1993). Bár a glutamát szinaptikus jelátvitelben betöltött neurotranszmitter szerepét kísérletes bizonyítékok hosszú sora igazolta, morfológiai kimutatását nagymértékben megnehezítette általános elterjedése az idegrendszer fehérjéiben.

A közelmúltban azonosították azokat a transzportfehérjéket, amelyek a glutamátot a szinaptikus vezikulába pumpálják. Vezikuláris glutamát transzportereknek (VGluT-ok) nevezték el, és a glutamáterg neuronok legmegbízhatóbb markereiként tartják számon őket (Bellocchio és mtsai, 2000; Takamori és mtsai, 2000). Mostanáig a VGluT-ok családjának három tagját (VGluT1-3) klónozták, amelyek megoszlását számos agyterületen és a gerincvelőben is leírták (Aihara és mtsai, 2000; Herzog és mtsai, 2001, Kaneko és mtsai, 2002, Takamori és mtsai, 2002). Kimutatták, hogy a gerincvelő különböző lamináiban végződő axonterminálisok más-más VGluT-ot expresszálnak, és az idegvégződésekben is csak minimális átfedést találtak közöttük

(Todd és mtsai, 2003; Alvarez és mtsai, 2004; Landry és mtsai, 2004). A gerincvelő felületes hátsó szarvát vizsgálva azt találták, hogy a VGluT1 immunreaktivitás nagyon elszórtan jelenik meg, vagy teljesen hiányzik, míg a VGluT2 intenzív, a VGluT3 pedig mérsékeltebb immunfestődést mutat a hátsó szarv I-II. laminájában (Todd és mtsai, 2003; Alvarez és mtsai, 2004; Landry és mtsai, 2004). Ezek a korábbi eredmények szinte teljesen megegyeznek a VGluT-ok gerincvelői expressziójára vonatkozó jelenlegi vizsgálatainkkal.

A hátsó szarv I-II. laminájának VGluT2 és VGluT3 immunfestődését ismerve váratlan volt, hogy a VGluT2 és HCN2 között csupán kismértékű kolokalizációt, a VGluT3 és HCN2 immunreaktivitás között pedig teljes szegregációt találtunk. A kolokalizáció szinte teljes hiánya azt jelzi, hogy a VGluT2- és VGluT3-pozitív axonok nem a HCN2-immunreaktív C és A $\delta$  primer afferensektől származnak. Leletünk alátámasztja a korábbi vizsgálatok eredményeit, amelyek a VGluT-immunreaktív rostok eredetére vonatkoznak a gerincvelő hátsó szarvában, és kimutatják, hogy a peptiderg primer afferenseknek, valamint a nem-peptiderg C rostoknak is csak elenyésző része immunreaktív VGluT2-re, illetve nagyrésztük egyik VGluT-ra sem festődik (Todd és mtsai, 2003; Alvarez és mtsai, 2004; Landry és mtsai, 2004). Az eddigi eredmények alapján tehát feltételezhető, hogy a három, ismert VGluT-on kívül egy további, ezidáig még ismeretlen vezikuláris glutamát transzporter expresszálódhat a nociceptív afferensekben (Todd és mtsai., 2003; Li és mtsai., 2003).

#### **5. 4. A HCN ioncsatornák 2-es izoformája (HCN2) és a P-anyag (SP) immunreaktivitásának kolokalizációja a gerincvelő felületes hátsó szarvában**

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a HCN2 intenzíven kolokalizál a kalcitonin génhez rendelt peptiddel (CGRP), és szinte teljesen elkülönül az izolektin-B4 (IB4) kötődéstől a gerincvelő felületes hátsó szarvában, ami azt jelzi, hogy a HCN2 elsősorban a peptiderg nociceptív primer afferensekben fejeződik ki. A peptiderg nociceptív primer afferensek különböző populációi CGRP-n kívül más neuropeptidet is tartalmazhatnak és felszabadíthatnak, többek között P-anyagot (SP), amely köztudottan döntő szerepet játszik a nociceptív ingerületek áttevődésében a primer afferensekről a másodlagos érzőneuronokra, és így hatékonyan részt vesz a fájdalomfeldolgozásban (Todd és mtsai, 2002; Willis és Coggeshall, 2004). Ezért kezdtük vizsgálni a HCN2-pozitív axonvégződés SP immunreaktivitását kettősen immunfestett metszeteken, és

igen nagymértékű kolokalizációt találtunk a HCN2 és SP immunreaktivitás között. Leleteink alapján feltételezhető, hogy a HCN2 ioncsatornák által mediált  $I_h$  ionáramok a fájdalomátviteli útvonal első átkapcsolódásánál modulálhatják a nociceptív primer afferensekről a másodlagos érzőneuronokra SP által közvetített szinaptikus ingerületáttevődést, és ezen keresztül a fájdalomfeldolgozási mechanizmusokat a gerincvelő felületes hátsó szarvában.

### **5. 5. A HCN2-immunreaktív axonterminálisok posztszinaptikus kapcsolatai a gerincvelő felületes hátsó szarvában**

Korábban már megállapították, hogy a nociceptív primer afferensek serkentő és gátló interneuronokkal egyaránt kapcsolatba lépnek a gerincvelő felületes hátsó szarvában (Carlton és Hayes, 1990; Wang és mtsai, 2000). Majmokban kimutatták, hogy a CGRP-immunreaktív, peptiderg nociceptív primer afferensektől szinaptikus kapcsolatot fogadó dendritek 28%-a GABA-t tartalmaz (Hayes és Carlton, 1992). Rágcsálókban viszont a nociceptív primer afferensek sokkal ritkábban alakítanak ki szinaptikus kapcsolatokat GABAerg posztszinaptikus elemekkel. A patkány gerincvelő hátsó szarvában azt találták, hogy a peptiderg nociceptív primer afferens axonvégződés legelterjedtebb formái, a nem-glomeruláris elrendeződést mutató terminálisok egyáltalán nem kerültek szinaptikus kapcsolatba GABA-immunreaktív dendritekkel (Bernardi és mtsai, 1995). Azonban azt is kimutatták, hogy a peptiderg nociceptív primer afferens terminálisok másik típusát adó glomeruláris C1 axonvégződés (Ribeiro-da-Silva és Coimbra, 1982; Ribeiro-da-Silva, 2004) 28%-a szinaptikus kapcsolatokat alakított ki GABAerg dendritekkel (Bernardi és mtsai, 1995). Érdekes megjegyezni, hogy a HCN2-t expresszáló peptiderg nociceptív primer afferens terminálisok döntő többségét nem-glomeruláris elrendeződésben találtuk, és csak kis hányaduk tartozott a glomeruláris C1 típusba. Mindezen korábbi adatok tükrében érthetőnek tűnik, hogy csak viszonylag kevés kapcsolatot találtunk a HCN2-immunreaktív terminálisok és a GAD65-eGFP-pozitív gerincvelői neuronok között. Következésképpen valószínű, hogy a HCN2 fehérjét expresszáló, peptiderg nociceptív primer afferensek elsősorban serkentő interneuronokkal létesítenek szinaptikus kapcsolatokat, és csak alkalmanként kerülnek kontaktusba gátló gerincvelői neuronokkal a rágcsálók gerincvelőjének hátsó szarvában.

Arról is vannak irodalmi adatok, hogy a SP-tartalmú primer afferensek aszimmetrikus szinapszisokat hoznak létre NK1-R-t kifejező neuronokkal és nem-szinaptikus kapcsolatokat, ún. szoros appozíciókat alakítanak ki MOR-immunreaktív idegsejtekkel a patkány gerincvelő felületes hátsó szarvában (Spike és mtsai, 2002; Todd és mtsai, 2002). Bár elektronmikroszkópos bizonyítékok nem állnak rendelkezésünkre, de a HCN2- és az SP nagymértékű kolokalizációja alapján feltételezhető, hogy a HCN2-t expresszáló SP-tartalmú primer afferensek is szinaptikus kapcsolatokat alakíthatnak ki az NK1-R-t, és nem-szinaptikus kapcsolatba kerülhetnek a MOR-t kifejező neuronokkal. Tovább színesíti a képet, hogy az NK1-immunreaktív neuronok projekciós neuronoknak bizonyultak, a MOR-pozitív idegsejtek pedig a serkentő interneuronok egyik alcsoportjának tekinthetők (Kemp és mtsai, 1996, Spike és mtsai, 2002, Todd és mtsai, 2002). Ezen adatok birtokában feltételezhető, hogy a preszinaptikus HCN2 ioncsatorna mechanizmusok befolyásolják a nociceptív ingerületátvitelt a SP-tartalmú primer afferensekről mind a gerincvelői projekciós idegsejtekre, mind az interneuronokra a gerincvelő felületes hátsó szarvában. Az  $I_h$  ionáram moduláló hatása viszont valószínűleg különbözhet a különféle posztszinaptikus neuronokon attól függően, hogy a HCN2-immunreaktív axonterminálisok valódi szinaptikus kapcsolatot, vagy csak szoros appozíciót alakítanak ki posztszinaptikus célsejtjeikkel.

#### **5. 6. A HCN2 ioncsatornák által mediált ionáram ( $I_h$ ) hatásai a C /A $\delta$ primer afferensek és a gerincvelői felületes hátsó szarv neuronjai között lévő szinaptikus jelátvitelre**

A központi idegrendszer serkentő szinapszisainak jelentős része rendelkezik azzal a figyelemreméltó képességgel, amellyel aktivitástól függő módon, hosszú távra fokozni tudja a benne lezajló szinaptikus ingerületáttevődés erejét és megbízhatóságát. Ezt a jelenséget az idegrendszer több területén is megfigyelték, és az agy különböző régióiban hosszú távú potencirozódásnak (long-term potentiation, LTP), a gerincvelő hátsó szarvában pedig hosszú távú facilitálásnak (long-term facilitation, LTF) nevezik. Úgy gondolják, hogy a nociceptív primer afferensek és a másodlagos gerincvelői interneuronok szinaptikus jelátvitelének tartós facilitálása (LTF) fontos szerepet játszhat a centrális szenzitizáció – a nociceptív, fájdalomfeldolgozó ideghálózatok ingerületi állapotának tartós fokozódása – kialakulásában (Ji és mtsai, 2003).

A preszinaptikus terminálisokban működő feszültségfüggő ioncsatornák képesek modulálni a transzmitterfelszabadulást, és ezáltal közreműködnek a hosszú távú potencirozás és facilitálás folyamatában. A feszültségfüggő ioncsatornák között a preszinaptikus HCN csatornák egyre több figyelmet kaptak az utóbbi időben, annak a feltételezésnek köszönhetően, hogy az ioncsatornák részt vehetnek a szinaptikus jelátvitel és plaszticitás preszinaptikus modulációjában. Beaumont és Zucker (2000) közölték először, hogy a HCN ioncsatornák aktivációja az ingerületátvitel szinaptikus facilitálását idézi elő a rákok neuromuszkuláris szinapszisában. Azt is kimutatták, hogy a hippocampus preszinaptikus moharostjainak hosszú távú potencirozódására is hatással van az  $I_h$  ionáram aktiválódása (Mellor és mtsai, 2002). Ezeket a korábbi megfigyeléseket jelenlegi elektrofiziológiai eredményeink is alátámasztják. A HCN ioncsatornák szelektív antagonistájának (ZD7288) alkalmazása során csökkent a gerincvelői szeletpreparátumok hátsó szarvi neuronjaiban teljes-sejt patch-clamp technikával mért monoszínaptikus EPSP-k száma, ami alapján azt feltételezzük, hogy az  $I_h$  növelheti a szinaptikus jelátvitel megbízhatóságát a primer afferensekről a másodlagos érzőneuronokra, és így szerepet játszhat a fájdalomátvitel preszinaptikus modulációjában a gerincvelő hátsó szarvában.

Felmerül a kérdés, hogy az  $I_h$  aktivációja hogyan fokozhatja a szinaptikus ingerületátvitel megbízhatóságát, és vezethet hosszú távú facilitáláshoz. Az egyik lehetséges magyarázat, hogy a HCN-csatornák aktiválódása felerősítheti a  $Ca^{2+}$ -beáramlást a preszinaptikus axonvégződésbe azáltal, hogy depolarizálja a terminálist és ezzel kiváltja a feszültségfüggő  $Ca^{2+}$ -csatornák megnyílását. Az ismétlődő ingerlések során beáramlott kalcium aktiválja a kalcium-kalmodulin-függő adenilát-cikláz, ami a cAMP szint emelkedését vonja maga után. Ugyanakkor a cAMP szintjének növekedése tovább fokozza az  $I_h$  ionáramot, és ezzel egyre nagyobb depolarizációt vált ki és lassítja a  $Ca^{2+}$ -csatornák deaktivációját az akciós potenciált követő hiperpolarizáció és repolarizáció alatt (Forsythe és mtsai, 1998; Cuttle és mtsai, 2001; Mellor és mtsai, 2002). Így az  $I_h$  ionáram elhúzódó aktivációja a megnövekedett  $Ca^{2+}$ -beáramlás miatt, elősegítheti a neurotranszmitterek fokozott felszabadulását (Yu és mtsai, 2004). Teljes-sejt patch-clamp technikát és fluoreszcens  $Ca^{2+}$ -imaging módszert kombinálva kimutatták, hogy a kalciumionok kismértékben még a HCN ioncsatornákon keresztül is bejuthatnak a sejtbe (Yu és mtsai, 2004). Ily módon a feszültségfüggő  $Ca^{2+}$ - vagy HCN-csatornák által közvetített  $Ca^{2+}$ -beáramlás olyan intracelluláris környezetet teremthet,

ami megfelelő háttérrel biztosít olyan  $I_h$  ionáram által mediált folyamatoknak, mint a preszinaptikus plaszticitás és a tartós facilitálás. Az  $I_h$  ionáram valószínűleg fontos szerepet játszhat az akciós potenciál utóhiperpolarizációs szakaszában is, amikor a kifelé tartó  $K^+$ -áram hatását ellensúlyozva megakadályozhatja a túlzott hiperpolarizációt (Weinreich és Wonderlin, 1987). Egy másik lehetőség szerint a HCN ioncsatornák fokozhatják a szinaptikus vezikulák mobilizációját a citoskeleton által közvetített lokális szignalizációs kaszkádfolyamatokon keresztül is (Beaumont és Zucker, 2000) anélkül, hogy bármilyen közvetlen kapcsolatban lennének a  $Ca^{2+}$ -beáramlással.

### **5. 7. Bilaterális változások a gerincvelő felületes hátsó szarvában teljes Freund-adjuváns (CFA) által kiváltott unilaterális talpgyulladás során**

A Freund-adjuvánsal indukált unilaterális talpgyulladás egyik legmeglepőbb eredménye, hogy bár a gyulladás unilaterális mechanikai allodiniát váltott ki, a gerincvelő felületes hátsó szarvában bilaterális neurokémiai változások alakultak ki. Amellett, hogy a HCN2- és SP-immunreaktivitás jelentősen megnövekedett az ipsilaterális hátsó szarvban, a HCN2- és SP-immunreaktív terminálisok száma emelkedést mutatott a kontralaterális hátsó szarv mediális és intermedier régiójában is. Hasonló változást tapasztaltunk a c-Fos-immunreaktív sejtszám tekintetében is, azzal a különbséggel, hogy a c-Fos-pozitív sejtek száma a felületes hátsó szarv teljes mediolaterális kiterjedésében növekedett a CFA-injekcióval ellentétes oldalon is.

Bár nem tudunk kielégítő magyarázatot adni arra, hogy az unilaterális CFA-injekció hogyan vált ki kontralaterális gerincvelői aktivitást, nagyon valószínűnek látszik, hogy többféle tényező összeadódása vezethet a jelenség kialakulásához. Egyrészt, megalapozott kísérletes eredmények bizonyítják, hogy a gerincvelő két oldalát kommisszurális axonok kötik össze egymással. Ezek a kommisszurális propriospinalis rendszerek szoros kapcsolatot alakítanak ki a kétoldali hátsó szarv között, így a kétoldali felületes hátsó szarv között is (Szentágothai, 1964; Matsushita, 1969; Petkó és Antal, 2000, Petkó és mtsai., 2004). A bejövő nociceptív ingerületek által közvetlenül vagy közvetve aktiválódó, ipsilaterálisan elhelyezkedő kommisszurális axonokkal rendelkező neuronok közvetítésével megváltozhat az ingerlés valódi helyéhez képest kontralaterális gerincvelői hátsó szarv nyugalmi aktivitása is. Másrészt, a gerincvelő-agy-gerincvelő összeköttetések részét képező supraspinalis eredetű leszálló pályák által közvetített ingerületek szintén

hozzájárulhatnak a kontralaterális változások kialakulásához. Az ipszilaterális hátsó szarv helyi szignalizációját követően, a CFA-val indukált gyulladás által kiváltódó fájdalomingerületek felszálló szenzoros pályák révén különböző, magasabb agyi központok felé továbbítódnak (Lima, 2009). A fájdalmi magatartásformák kialakításáért felelős subcorticalis magvakon és agykérgi területeken kívül a felszálló pályák számos olyan agyterületet is aktiválnak, amelyek unilaterális és bilaterális leszálló pályákat küldenek a gerincvelő hátsó szarvához (Ren és Dubner, 2009). Ezek a bilaterálisan leszálló pályák jelentős mértékben hozzájárulhatnak a CFA-injekcióval ellentétes oldali hátsó szarvban lévő ideghálózatok aktiválódásához.

Annak ellenére, hogy a kontralaterális hátsó szarvban fellépő idegi aktivitások nem elég erősek ahhoz, hogy mechanikai allodyniát váltsanak ki, illetve azok a mechanizmusok, amelyekkel a helyi és/vagy supraspinalis neuronhálózatok az unilaterális talpgyulladást követően képesek bilaterális neurokémiai változásokat indukálni a gerincvelő hátsó szarvában, még ismeretlenek, maga a jelenség rendkívül figyelemre méltó. Többek között ugyanis ez azt is jelenti, hogy az unilaterális kísérleti beavatkozások során a gerincvelői hátsó szarvban fellépő válaszreakciók értékelésénél a gerincvelő kontralaterális oldalát nem tekinthetjük kontrollnak. Az unilaterális perifériás kísérleti kezeléseket követően, az ipszi- és kontralaterális hátsó szarvból származó adatok összehasonlítása, kezeletlen állatokból nyert valódi kontroll értékek nélkül, a kísérleti eredmények hibás értékelését eredményezheti.

### **5. 8. Preszinaptikus HCN2 ioncsatornák a nociceptív primer afferensek centrális axonterminálisaiban gyulladásoos fájdalomban**

Számottevő molekuláris és farmakológiai kísérletes adat bizonyítja, hogy a HCN ioncsatornák jelentős szerepet játszanak a szenzoros neuronok működésében, különösen ideg- vagy szövetsérüléshez kapcsolódó fájdalom esetén (Chaplan és mtsai., 2003; Yao és mtsai., 2003; Brown és mtsai., 2004; Luo és mtsai., 2007). A HCN ioncsatornák által közvetített hiperpolarizáció során aktiválódó ionáramok ( $I_h$ ) nagymértékben hozzájárulnak ahhoz, hogy a sérült primer afferens neuronok spontán, ún. ektopikus akciós potenciálokat generáljanak, amelyek végső soron fájdalomérzet kialakulásához vezetnek (Chaplan és mtsai., 2003, Yao és mtsai., 2003; Dalle és Eisenach, 2005; Lee és mtsai., 2005; Tu és mtsai., 2006).

Korábbi eredmények alapján az is feltételezhető, hogy a neuropátiás fájdalom mellett, a HCN2 ioncsatorna-mechanizmusoknak lehet bizonyos szerepe a fájdalomfeldolgozó ideghálózatok centrális szenzitizációjának kialakításában krónikus gyulladással járó fájdalomállapotokban is. Cho és mtsai. (2009) nemrég kimutatták, hogy 3-4 nappal a dura mater gyulladását követően emelkedik a HCN fehérjék mennyisége a ganglion trigeminaleban és megduplázódik a dura matert beidegző neuronok között a HCN2-immunreaktív neuronok száma. Egy másik közleményben Dunlop és mtsai. (2009) kimutatták, hogy a specifikus HCN ioncsatorna-blokkoló, ZD7288 intraperitonealis alkalmazása a koncentráció függvényében mérsékli a patkányok talpának karragenin-injekció által kiváltott termális hiperszenzitivitását, és nagyobb dózisban teljesen megszünteti a hiperszenzitivitást. Ezenkívül azt is leírták, hogy a ZD7288 intrathecalis alkalmazása csökkenti a mechanikai allodyníát (Jiang és mtsai., 2008). Saját eredményeinket összevetve ezekkel a korábbi eredményekkel, valószínűnek tűnik, hogy a HCN2 ioncsatorna-fehérjék túlermelődése a gerincvelő felületes hátsó szarvában legalább részben magyarázatul szolgálhat a ZD7288 alkalmazása során megfigyelt fájdalomcsillapító hatásnak.

Elektrofiziológiai mérésekkel számos preszinaptikus axonvégződésben kimutatták az  $I_h$  jelenlétét, többek között a rákok neuromuszkuláris szinapszisában (Beaumont és Zucker, 2000), a madarak ganglion ciliarejában (Fletcher és Chiappinelli, 1992), a kisagyban kosársejtekben (Southan és mtsai., 2000) és a nucleus cochlearis bushy-sejtjeinek preszinaptikus végződéseiben (Held-féle kelyhek) (Cuttle és mtsai., 2001). Ezek a vizsgálatok számos bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy a preszinaptikus HCN ioncsatorna-mechanizmusok szerepet játszanak a szinaptikus jelátvitel szabályozásában. Rákok motoneuronjainak axonvégződéseiben kimutatták, hogy az  $I_h$  cAMP-függő erősödése a szinaptikus ingerületáttevődés hosszú távú facilitálását okozza (Beaumont és Zucker, 2000; Beaumont és mtsai., 2002). Ezekkel a megfigyelésekkel összhangban gerincvelői szeletpreparátumokban korábban kimutattuk, hogy ZD7288 alkalmazása lecsökkenti a nociceptív primer afferensek és másodlagos gerincvelői interneuronok közötti szinaptikus jelátvitel hatékonyságát. Ez alapján feltételeztük, hogy a HCN2 ioncsatornák működése növeli a primer afferensek és a másodlagos érzőneuronok között a szinaptikus jelátvitel megbízhatóságát, és ezáltal szerepet játszhat a gerincvelői nociceptív jelátvitel preszinaptikus modulációjában (Papp és mtsai., 2006).

Egyik korábbi közleményünkben leírtuk, hogy a HCN2 és SP immunreaktivitás jelentős kolokalizációt mutat a nociceptív primer afferensek centrális axonterminálisaiban (Papp és mtsai., 2006). Mások vizsgálataiból az is jól ismert, hogy a P-anyag fontos szerepet játszik a nociceptív ingerületek áttevődésében a primer afferensekről a gerincvelői másodlagos érzőneuronokra (Naim és mtsai., 1997; Todd és mtsai., 2002; Willis és Coggeshall, 2004). Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a HCN2 és SP között lévő nagymértékű kolokalizáció azt jelzi, hogy a HCN2 ioncsatornák által közvetített  $I_h$  modulálhatja a P-anyag mediálta fájdalomfeldolgozást a gerincvelő felületes hátsó szarvában. Az SP által mediált szinaptikus jelátvitel és a preszinaptikus HCN2 ioncsatorna-mechanizmusok közti szoros összefüggést a Freund-adjuvánszal indukált gyulladáson alapuló fájdalomállapotban kapott eredményeink is megerősítik. A CFA-injekcióval kiváltott talpgyulladás során a gerincvelői felületes hátsó szarv HCN2 immunreaktivitása párhuzamosan emelkedett az SP immunreaktivitásával. Továbbá a HCN2 és SP immunreaktivitás közti kolokalizáció, akár csak naív állatokban, rendkívül magas értéket mutatott a CFA injekciót követően is, ami azt sugallja, hogy azoknak a nociceptív primer afferenseknek a centrális axonvégződéseiben, amelyekben emelkedett az SP expressziója a CFA-val kiváltott talpgyulladás hatására, növekedett a HCN2 kifejeződése is. Ez a nagyon erős kapcsolat a HCN2 és SP expresszió között azt jelzi, hogy a HCN2 ioncsatorna-mechanizmusok nemcsak ép állapotban, hanem krónikus gyulladáson alapuló fájdalomban is szerepet játszhatnak az SP által közvetített gerincvelői fájdalomfeldolgozásban.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

A hiperpolarizáció által aktiválódó ciklikus nukleotid-függő kationcsatornák (HCN) és az általuk közvetített hiperpolarizáció során indukálódó kationáram ( $I_h$ ) fontos szerepet töltenek be az idegsejtek elektromos tulajdonságainak kialakításában és a szinaptikus ingerületáttevődés finomhangolásában. Jelen munkában immunhisztokémiai módszerekkel kimutattuk, hogy sejtestjeiken kívül a gerincvelői dúcsejtek egy részének centrális axonterminálisai is expresszálják a HCN ioncsatornák 2-es izoformáját (HCN2) a patkány gerincvelő hátsó szarvának I-IIo lamináiban. Az I-IIo laminákban végződő primer afferensek neurokémiai azonosításával kimutattuk, hogy HCN2 immunreaktivitást a peptiderg típusú nociceptív primer afferens terminálisok mutatnak. További karakterizálás során azt is sikerült kimutatnunk, hogy a HCN2-pozitív axonterminálisok erőteljes immunreaktivitást mutatnak P-anyagra is. A HCN2-pozitív nociceptív primer afferensek posztszinaptikus kapcsolatait vizsgálva kiderült, hogy elsődlegesen a neurokinin1-receptor-, a calbindin-, az AMPA-típusú glutamát-receptor 2-es alegység- és a  $\mu$ -opioid-receptor-immunreaktív (feltételezhetően serkentő) interneuronok sejtestjeivel és dendritjeivel alakítanak ki szoros appozíciókat, bár szórványosan GAD65-pozitív (feltételezhetően gátló) interneuronokkal is kapcsolatba lépnek. Elektrofiziológiai vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a nociceptív primer afferensek axonterminálisain kifejeződő HCN2 ioncsatornák funkcióképesek, és növelik a nociceptív primer afferensek és a másodlagos érzőneuronok közötti ingerületáttevődés megbízhatóságát, ezáltal fontos szerepet játszhatnak a nociceptív ingerületátvitel preszinaptikus modulációjában.

Teljes Freund-adjuvánsnak kísérleti állatok talpába való injektálását követően kialakuló gyulladással járó fájdalomállapotban jelentősen nőtt a HCN2 csatornafehérjére immunreaktivitást mutató peptiderg nociceptív primer afferens terminálisok száma. Úgy találtuk, hogy azoknak az axonterminálisoknak a többségében, amelyekben a krónikus gyulladás a HCN2 csatorna fehérje expresszióját váltotta ki, P-anyag immunreaktivitás is megjelent. Ez a leletünk azt sugallja, hogy a HCN2 csatorna által modulált preszinaptikus mechanizmusok elsődlegesen a P-anyag által közvetített fájdalomingerületek szinaptikus áttevődését befolyásolják.

A HCN2 ioncsatornák gerincvelői expressziójának és a nociceptív jelátvitelben betöltött szerepének leírásával eredményeink hozzájárultak a gerincvelő hátsó szarvi nociceptív neuronhálózatok morfo-funkcionális tulajdonságainak pontosabb megismeréséhez, és kiindulópontul szolgálhatnak a HCN ioncsatorna-mechanizmusok gátlásán keresztül ható fájdalomcsillapító gyógyszerek kifejlesztéséhez.

## **Cellular distribution of HCN2 ion channel immunoreactivity in the spinal dorsal horn of rats in control and inflammatory pain conditions**

Ildikó Papp, Department of Anatomy, Histology and Embryology

University of Debrecen, Medical and Health Science Center, Hungary

### **SUMMARY**

Hyperpolarization-activated currents ( $I_h$ ) mediated by hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels (HCN) play an important role in shaping up the electrical properties of neurons and fine-tuning of synaptic transmission. Utilizing immunocytochemical methods, here we demonstrated that – in addition to perikarya – HCN ion channel protein isoform 2 (HCN2) is also expressed by central axon terminals of some population of dorsal root ganglion (DRG) neurons in laminae I-IIo of the spinal dorsal horn of rats. With precise neurochemical identification of primary afferents terminating in laminae I-IIo, we demonstrated that HCN2 immunoreactivity is shown by peptidergic nociceptive primary afferent terminals. With further characterization, we also demonstrated that HCN2-positive axon terminals display also a strong immunoreactivity for substance P. Investigating the postsynaptic targets of HCN2-positive nociceptive primary afferents, it was revealed that these afferents primarily form close appositions with dendrites and perikarya of putative excitatory interneurons that are immunoreactive for neurokinin1 receptor, calbindin, GluR2 subunits of AMPA type glutamate receptors and  $\mu$ -opioid receptor, but they sparsely come also into contact with GAD65-positive inhibitory interneurons. Our electrophysiological studies confirmed that HCN2 ion channels expressed by axon terminals of nociceptive primary afferents are functional and their activation increase the reliability of synaptic transmission from nociceptive primary afferents to secondary sensory neurons and thus may play an important role in the presynaptic modulation of nociceptive synaptic transmission.

In chronic inflammatory pain state evoked by intraplantar injection of complete Freund's adjuvant into the hindpaw of experimental animals, the number of peptidergic nociceptive primary afferent terminals immunoreactive for HCN2 channel protein was substantially increased. It was also found that in the majority of axon terminals, showing elevated HCN2 channel protein expression in chronic inflammation, substance-P immunoreactivity was also enhanced. This finding suggests that presynaptic mechanisms modulated by  $I_h$  currents may primarily play a role in synaptic mechanisms mediated by substance-P release.

With the description of spinal expression of HCN2 ion channels and their role in nociceptive transmission, our results contributed to a more exhaustive understanding of the morpho-functional properties of nociceptive neural circuits in the spinal dorsal horn and may initiate further studies that may lead to the development of analgesic drugs inhibiting HCN ion channel mechanisms.

## 7. IRODALOMJEGYZÉK

- Abbadie, C., Pasternak, G. W. & Aicher, S. A. 2001. Presynaptic localization of the carboxy-terminus epitopes of the  $\mu$ -opioid receptor splice variants MOR-1C and MOR-1D in the superficial laminae of the rat spinal cord. *Neuroscience*, 106, 833-842.
- Accili, E. A., Proenza, C., Baruscotti, M. & DiFrancesco, D. 2002. From funny current to HCN channels: 20 years of excitement. *News Physiol. Sci.*, 17, 32-37.
- Aihara, Y., Mashima, H., Onda, H., Hisano, S., Kasuya, H., Hori, T., Yamada, S., Tomura, H., Yamada, Y., Inoue, I., Kojima, I. & Takeda, J. 2000. Molecular cloning of a novel brain-type  $\text{Na}^+$ -dependent inorganic phosphate cotransporter. *J. Neurochem.*, 74, 2622-2625.
- Alonso, A. & Llinas, R. R. 1989. Subthreshold  $\text{Na}^+$ -dependent theta-like rhythmicity in stellate cells of entorhinal cortex layer II. *Nature*, 342, 175-177.
- Alvarez, F. J., Villalba, R. M., Zerda, R. & Schneider, S. P. 2004. Vesicular glutamate transporters in the spinal cord, with special reference to sensory primary afferent synapses. *J. Comp. Neurol.*, 472, 257-280.
- Amir, R. & Devor, M. 1996. Chemically mediated cross-excitation in rat dorsal root ganglia. *J. Neurosci.*, 16, 4733-4741.
- Amir, R. & Devor, M. 1997. Spike-evoked suppression and burst patterning in dorsal root ganglion neurons of the rat. *J. Physiol. (Lond.)*, 501, 183-196.
- Antal, M., Polgár, E., Chalmers, J., Minson, J. B., Llewellyn-Smith, I., Heizmann, C. W. & Somogyi, P. 1991. Different populations of parvalbumin- and calbindin-D28k-immunoreactive neurons contain GABA and accumulate 3H-D-aspartate in the dorsal horn of the rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, 314, 114-124.
- Bader, C. R., Macleish, P.R. & Schwartz, E.A. 1979. A voltage-clamp study of the light response in solitary rods of the tiger salamander. *J. Physiol.*, 296, 1-26.
- Bader, C. R. & Bertrand, D. 1984. Effect of changes in intra- and extracellular sodium on the inward (anomalous) rectification in salamander photoreceptors. *J. Physiol.* 347. 611-631.
- Baker, M., Bostock, H., Grafe, P. & Martius, P. 1987. Function and distribution of three types of rectifying channel in rat spinal root myelinated axons. *J. Physiol.* 383. 45-67.
- Beaumont, V. & Zucker, R. S. 2000. Enhancement of synaptic transmission by cyclic AMP modulation of presynaptic  $I_h$  channels. *Nat. Neurosci.*, 3, 133-141.
- Beaumont, V., Zhong, N., Froemke, R. C., Ball, R. W. & Zucker, R. S. 2002. Temporal synaptic tagging by  $I_h$  activation and actin: involvement in long-term facilitation and cAMP-induced synaptic enhancement. *Neuron*, 33, 601-613.
- Bellocchio, E. E., Reimer, R. J., Fremeau, R. T. Jr & Edwards, R. H. 2000. Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science*, 289, 957-960.
- Bernardi, P. S., Valtschanoff, J. G., Weinberg, R. J., Schmidt, H. H. H. W. & Rustioni, A. 1995. Synaptic interactions between primary afferent terminals and GABA and nitric oxide-synthesizing neurons in superficial laminae of the rat spinal cord. *J. Neurosci.*, 15, 1363-1371.
- Biel, M., Schneider, A. & Wahl, C. 2002. Cardiac HCN channels. Structure, function and modulation. *Trends Cardiovasc. Med.*, 12, 206-213.

- Bois, P., Bescond, J., Renaudon, B. & Lenfant, J. 1996. Mode of action of bradycardic agent, S 16257, on ionic currents of rabbit sinoatrial node cells. *Br. J. Pharmacol.*, 118, 1051-1057.
- Broman, J., Anderson, S. & Ottersen, O. P. 1993. Enrichment of glutamate-like immunoreactivity in primary afferent terminals throughout the spinal cord dorsal horn. *Eur. J. Neurosci.*, 5, 1050-1061.
- Brown, H. F., DiFrancesco, D. & Noble, S. J. 1979. How does adrenalin accelerate the heart? *Nature*, 280, 235-236.
- Brown, S. M., Dubin, A. E. & Chaplan, S. R. 2004. The role of pacemaker currents in neuropathic pain. *Pain Pract.*, 4, 182-193.
- Buzsaki, G. 2002. Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron*, 33, 325-340.
- Carlton, S. M. & Hayes, E. S. 1990. A light microscopic and ultrastructural analysis of GABA-immunoreactive profiles in the monkey spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, 300, 162-182.
- Carlton, S. M., Hargett, G. L. & Coggeshall, R. E. 2001. Localization of metabotropic glutamate receptors 2/3 on primary afferent axon in the rat. *Neuroscience*, 105, 957-969.
- Carlton, S. M., & Coggeshall, R. E. 2002. Inflammation-induced upregulation of neurokinin 1 receptors in rat glabrous skin. *Neurosci. Lett.*, 326, 29-32.
- Chaplan, S. R., Guo, H. Q., Lee, D. H., Luo, L., Liu, C., Kuei, C., Velumian, A. A., Butler, M. P., Brown, S. M. & Dubin, A. E. 2003. Neuronal hyperpolarization-activated pacemaker channels drive neuropathic pain. *J. Neurosci.*, 23, 1169-1178.
- Chen, S., Wang, J. & Siegelbaum, S. A. 2001. Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of hcn1 and hcn2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *J. Gen. Physiol.* 117, 491-504.
- Cho, H. J., Staikopoulos, V., Furness, J. B., & Jennings, E. A. 2009. Inflammation-induced increase in hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channel protein in trigeminal ganglion neurons and the effect of buprenorphine. *Neuroscience*, 162, 453-461.
- Cuttle, M. F., Rusznák, Z., Wong, A.Y. C., Owens, S. & Forsythe, I. D. 2001. Modulation of a presynaptic hyperpolarization-activated cationic current (I<sub>h</sub>) at an excitatory synaptic terminal in the rat auditory brainstem. *J. Physiol.*, 534, 733-744.
- Dalle, C. & Eisenach, J. C. 2005. Peripheral block of the hyperpolarization-activated cation current (I<sub>h</sub>) reduces mechanical allodynia in animal models of postoperative and neuropathic pain. *Reg. Anesth. Pain Med.*, 30, 243-248.
- De Marchis, S., Temoney, S., Erdélyi, F., Bovetti, S., Bovolín, P., Szabó, G. & Puche, A. C. 2004. GABAergic phenotypic differentiation of a subpopulation of subventricular derived migrating progenitors. *Eur. J. Neurosci.*, 20, 1307-1317.
- Devor, M. & Wall, P. D. 1990. Cross-excitation in dorsal root ganglia of nerve-injured and intact rats. *J. Neurophysiol.*, 64, 1733-1746.
- Dickson, C. T., Magistretti, J., Shalinsky, M. H., Fransen, E., Hasselmo, M. E. & Alonso, A. 2000. Properties and role of I<sub>h</sub> in the pacing of subthreshold oscillations in entorhinal cortex layer II neurons. *J. Neurophysiol.*, 83, 2562-2579.
- DiFrancesco, D. 1981. A new interpretation of the pacemaker current in calf Purkinje fibres. *J. Physiol.*, 314, 359-376.
- DiFrancesco, D. 1986. Characterization of single pacemaker channels in cardiac sinoatrial node cells. *Nature*, 324, 470-473.
- DiFrancesco, D. & Tortora, P. 1991. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature*, 351, 145-147.

- DiFrancesco, D. 1993. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu. Rev. Physiol.*, 55, 455-472.
- Doan, T. N., Stephans K., Ramirez, A. N., Glazebrook, P. A., Andresen, M. C. & Kunze, D. L. 2004. Differential distribution and function of hyperpolarization-activated channels in sensory neurons and mechanosensitive fibers. *J. Neurosci.*, 24, 3335-3343.
- Dunlop, J., Vasilyev, D., Lu, P., Cummons, T. & Bowlby, M. R. 2009. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels and pain. *Curr. Pharm. Des.*, 15, 1767-1772.
- Fletcher, G. H. & Chiappinelli, V. A. 1992. An inward rectifier is present in presynaptic nerve terminals in the chick ciliary ganglion. *Brain Res.*, 575, 103-112.
- Forsythe, I. D., Tsujimoto, T., Barnes-Davies, M., Cuttle, M. F. & Takahashi, T. 1998. Inactivation of presynaptic calcium current contributes to synaptic depression at a fast central synapse. *Neuron*, 20, 797-807.
- Gasparini, S. & DiFrancesco, D. 1997. Action of the hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) blocker ZD 7288 in hippocampal CA1 neurons. *Pflügers Arch.*, 435, 99-106.
- Gerke, M. B. & Plenderleith, M. B. 2002. Analysis of the distribution of binding sites for the plant lectin *Bandeiraea simplicifolia* I-isolectin B<sub>4</sub> on primary sensory neurons in seven mammalian species. *Anat. Rec.*, 268, 105-114.
- Grafe, P., Quasthoff, S., Grosskreutz, J. & Alzheimer, C. 1997. Function of the hyperpolarization-activated inward rectification in nonmyelinated peripheral rat and human axons. *J. Neurophysiol.*, 77, 421-426.
- Halliwell, J. V. & Adams, P. R. 1982. Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res.*, 250, 71-92.
- Han, H. C., Lee, D. H. & Chung, J. M. 2000. Characteristics of ectopic discharges in a rat neuropathic pain model. *Pain*, 84, 253-261.
- Harris, J. A. 1998. Using c-fos as a neural marker of pain. *Brain Res. Bull.*, 45, 1-8.
- Harris, N. C. & Constanti, A. 1995. Mechanism of block by ZD7288 of the hyperpolarization-activated inward rectifying current in guinea pig substantia nigra neurons in vitro. *J. Neurophysiol.*, 74, 2366-2378.
- Hayes, E. S. & Carlton, S. M. 1992. Primary afferent interaction: analysis of calcitonin gene-related peptide-immunoreactive terminals in contact with unlabeled and GABA-immunoreactive profiles in the monkey dorsal horn. *Neuroscience*, 47, 873-896.
- Herzog, E., Bellenchi, G. C., Gras, C., Bernard, V., Ravassard, P., Bedet, C., Gasnier, B. & El Mestikawy, S. 2001. The existence of a second vesicular glutamate transporter specific subpopulations of glutamatergic neurons. *J. Neurosci.*, 21, RC181.
- Hille, B. 1992. Ionic channels of excitable membranes. 2nd Ed. Sunderland, MA: Sinauer.
- Huang, C. F., S. M. Voglmaier, S. M., Bembenek, M. E., Saiardi, A. & Snyder, S. H. 1998. Identification and purification of diphosphoinositol pentakisphosphate kinase, which synthesizes the inositol pyrophosphate bis(diphospho)inositol tetrakisphosphate. *Biochemistry*, 37, 14998-15004.
- Hughes, D. I., Mackie, M., Nagy, G.G., Riddell, J. S., Maxwell, D. J., Szabó, G., Erdélyi, F., Veress, G., Szűcs, P., Antal, M. & Todd, A. J. 2005. P boutons in lamina IX of the rodent spinal cord express high levels of glutamic acid decarboxylase-65

- and originate from cells in deep medial dorsal horn. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102, 9038-9043.
- Hunt, S.P., Pini, A. & Evan G. 1987. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*, 328, 632-634.
- Iadarola, M. J., Brady, L. S., Draisci, G. & Dubner, R. 1988. Enhancement of dynorphin gene expression in spinal cord following experimental inflammation: stimulus specificity, behavioral parameters and opioid receptor binding. *Pain*, 35, 313-326.
- Ishii, T. M., Takano, M., Xie, L. H., Noma, A. & Ohmori, H. 1999. Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J. Biol. Chem.*, 274, 12835-12839.
- Ji, R. R., Kohno, T., Moore, K. A. & Woolf, C. J. 2003. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci.*, 26, 696-705.
- Jiang, Y. Q., Xing, G. G., Wang, S. L., Tu, H. Y., Chi, Y. N., Li, J., Liu, F. Y., Han, J. S. & Wan, Y. 2008. Axonal accumulation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels contributes to mechanical allodynia after peripheral nerve injury in rat. *Pain*, 137, 495-506.
- Kaneko, T., Fujiyama, F. & Hioki, H. 2002. Immunohistochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat brain. *J. Comp. Neurol.*, 444, 39-62.
- Kaupp, U. B. & Seifert, R. 2001. Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu. Rev. Physiol.*, 63, 235-257.
- Kawasaki, Y., Kumamoto, E., Furue, H. & Yoshimura, M. 2003. Alfa2 adrenoceptor-mediated presynaptic inhibition of primary afferent glutamatergic transmission in rat substantia gelatinosa neurons. *Anesthesiology*, 98, 682-689.
- Kemp, T., Spike, R. C., Watt, C. & Todd, A. J. 1996. The mu-opioid receptor (MOR1) is mainly restricted to neurons that do not contain GABA or glycine in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience*, 75, 1231-1238.
- Kiehn, O. & Harris-Warrick, R. M. 1992. 5-HT modulation of hyperpolarization-activated inward current and calcium-dependent outward current in a crustacean motor neuron. *J. Neurophysiol.*, 68, 496-508.
- Krieger, P. & El Manira, A. 2002. Group III mGluR-mediated depression of sensory synaptic transmission. *Brain Res.*, 937, 41-44.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Landry, M., Bouali-Benazzouz, R., Mestikawy, S. E., Ravassard, P. & Nagy, F. 2004. Expression of vesicular glutamate transporters in rat lumbar spinal cord, with a note on dorsal root ganglia. *J. Comp. Neurol.*, 468, 380-394.
- Lawson, S. N. 1995. Neuropeptides in morphologically and functionally identified primary afferent neurons in dorsal root ganglia: substance P, CGRP and somatostatin. *Prog. Brain Res.*, 104, 161-173.
- Lecci, A., Giuliani, S., Tramontana, M., Carini, F. & Maggi, C. A. 2000. Peripheral actions of tachykinins. *Neuropeptides*, 34, 303-313.
- Lee, D. H., Chang, L., Sorkin, L. S. & Chaplan, S. R. 2005. Hyperpolarization-activated, cation-nonspecific, cyclic nucleotide-modulated channel blockade alleviates mechanical allodynia and suppresses ectopic discharge in spinal nerve ligated rats. *J. Pain*, 6, 417-424.
- Levin, J. D., Fields, H. L. & Basbaum, A. I. 1993. Peptides and the primary afferent nociceptor. *J. Neurosci.*, 13, 2273-2286.

- Li, J. L., Fujimaya, F., Kaneko, T. & Mizuno, N. 2003. Expression of vesicular glutamate transporters, VGluT1 and VGluT2, in axon terminals of nociceptive primary afferent fibers in the superficial layers of the medullary and spinal dorsal horns of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 457, 236-249.
- Lima, D. 2009. Ascending pathways: Anatomy and physiology. In Basbaum, A. I. and Buschnell C. (eds), *Science of Pain*, Elsevier, Oxford, pp. 477-526.
- Littlewood, N. K., Todd, A. J., Spike, R. C., Watt, C. & Shebab, S. A. S. 1995. The types of neuron in spinal dorsal horn which possess neurokinin-1 receptors. *Neuroscience*, 66, 597-608.
- Liu, H., Brown, J. L., Jasmin, L., Maggio, J. E., Vigna, S. R., Mantyh, P. W. & Basbaum, A. I. 1994. Synaptic relationships between substance P and electron microscopic characterization of the mismatch between neuropeptides and their receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 91, 1009-1013.
- Ludwig, A., Zong, X., Jeglitsch, M., Hofmann, F. & Biel, M. 1998. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature*, 393, 587-591.
- Luo, L., Chang, L., Brown, S. M., Ao, H., Lee, D. H., Higuera, E. S., Dubin, A. E. & Chaplan, S. R. 2007. Role of peripheral hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-modulated channel pacemaker channels in acute and chronic pain models in the rat. *Neuroscience*, 144, 1477-1485.
- Ma, Q. P. & Woolf, C. J. 1996. Basal and touch-evoked fos-like immunoreactivity during experimental inflammation in the rat. *Pain*, 67, 307-316.
- Magee, J. C. 1998. Dendritic hyperpolarization-activated currents modify the integrative properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurosci.*, 18, 7613-7624.
- Magee, J. C. 1999. Dendritic I<sub>h</sub> normalizes temporal summation in hippocampal CA1 neurons. *Nat. Neurosci.*, 2, 508-514.
- Matsushita, M. 1969. Some aspects of the interneuronal connections in cat's spinal gray matter. *J. Comp. Neurol.*, 136, 316-332.
- Mayer, M. L. & Westbrook, G. L. 1983. A voltage-clamp analysis of inward (anomalous) rectification in mouse spinal sensory ganglion neurons. *J. Physiol., (Lond.)*, 340, 19-45.
- McCormick, D. A. & Pape, H. C. 1990. Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation of thalamic relay neurons. *J. Physiol. (Lond.)*, 431, 291-318.
- Mellor, J., Nicoll, R. A. & Schmitz, D. 2002. Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by presynaptic I<sub>h</sub> channels. *Science*, 295, 143-147.
- Millan, M. J., Czlonkowski, A., Morris, B., Stein, C., Arendt, R., Huber, A., Hollt, V. & Herz, A. 1988. Inflammation of the hind limb as a model of unilateral, localized pain: influence on multiple opioid systems in the spinal cord of the rat. *Pain*, 35, 299-312.
- Moosmang, S., Biel, M., Hofmann, F. & Ludwig, A. 1999. Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. *Biol. Chem.*, 380, 975-980.
- Moosmang, S., Stieber, J., Zong, X., Biel, M., Hofmann, F. & Ludwig, A. 2001. Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur. J. Biochem.*, 268, 1646-1652.
- Morgan, J. I., Cohen, D. R., Hempstead, J. L. & Curran, T. 1987. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science*, 237, 192-197.

- Morgan, J. I. & Curran, T. 1991. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: Involvement of the inducible proto-oncogenes *fos* and *jun*. *Annu. Rev. Neurosci.*, 14, 133-141.
- Moussaoui, S. M., Hermans, E., Mathieu, A. M., Bonici, B., Clerc, F., Guinet, F., Garret, C. & Laduron, P. M. 1992. Polyclonal antibodies against the rat NK1 receptor: characterization and localization in the spinal cord. *Neuroreport*, 3, 1073-1076.
- Munzlani, R. & Hunt, S. P. 1995. Molecular biology of pain. *Br. J. Anaesth.*, 75, 186-192.
- Musialek, P., Lei, M., Brown, H. F., Paterson, D. J. & Casadei, B. 1997. Nitric oxide can increase heart rate by stimulating the hyperpolarization-activated inward current, I(f). *Circ. Res.*, 81, 60-68.
- Müller, F., Scholten, A., Ivanova, E., Haverkamp, S., Kremmer, E. & Kaupp, U. B. 2003. HCN channels are expressed differentially in retinal bipolar cells and concentrated at synaptic terminals. *Eur. J. Neurosci.*, 17, 2084-2096.
- Naim, M., Spike, R. C., Watt, C., Shehab, S. A. S. & Todd, A. J. 1997. Cells in laminae III and IV of the rat spinal cord that possess the neurokinin-1 receptor and have dorsally directed dendrites receive a major synaptic input from tachykinin-containing primary afferents. *J. Neurosci.*, 17, 5536-5548.
- Nakaya, Y., Kaneko, T., Shigemoto, R., Nakanishi, S. & Mizuno, N. 1994. Immunohistochemical localization of substance P receptor in the central nervous system of the adult rat. *J. Comp. Neurol.*, 347, 249-274.
- Nicoll, A., Larkman, A. & Blakemore, C. 1993. Modulation of EPSP shape and efficacy by intrinsic membrane conductances in rat neocortical pyramidal neurons in vitro. *J. Physiol.*, 468, 693-710.
- Noma, A. & Irisawa, H. 1976. Membrane currents in the rabbit sinoatrial node cell as studied by the double microelectrode method. *Pflügers Arch.*, 364, 45-52.
- Oliver, D., Lien C. C., Soom M., Baukowitz, T., Jonas, P. & Fakler, B. 2004. Functional conversion between A-type and delayed rectifier K<sup>+</sup> channels by membrane lipids. *Science*, 304, 265-270.
- Pal, B., Por, A., Szucs, G., Kovacs, I. & Rusznak, Z. 2003. HCN channels contribute to the intrinsic activity of cochlear pyramidal cells. *Cell Mol. Life Sci.*, 60, 2189-2199.
- Pape, H. C. & Mager, R. 1992. Nitric oxide controls oscillatory activity in thalamocortical neurons. *Neuron*, 9, 441-448.
- Pape, H. C. 1996. Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu. Rev. Physiol.*, 58, 299-327.
- Petkó, M. & Antal, M. 2000. Propriospinal afferent and efferent connections of the lateral and medial areas of the dorsal horn (laminae I-IV) in the rat lumbar spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, 422, 312-325.
- Petkó, M., Veress, G., Vereb, G., Storm-Mathisen, J. & Antal, M. 2004. Commissural propriospinal connections between the lateral aspects of laminae III-IV in the lumbar spinal cord of rats. *J. Comp. Neurol.*, 480, 364-377.
- Proenza, C., Tran, N., Angoli, D., Zahynacz, K., Balcar, P. & Accili, E. A. 2002. Different roles for the cyclic nucleotide binding domain and amino terminus in assembly and expression of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channels. *J. Biol. Chem.*, 277, 29634-29642.
- Przewlocki, R. & Przewlocka, B. 2001. Opioids in chronic pain. *Eur. J. Pharmacol.*, 429, 79-91.

- Qu, J., Barbuti, A., Protas, L., Santoro, B., Cohen, I. S. & Robinson, R. B. 2001. HCN2 overexpression in newborn and adult ventricular myocytes: distinct effects on gating and excitability. *Circ. Res.*, 89, 8-14.
- Raman, I. M. & Bean, B. P. 1999. Ionic currents underlying spontaneous action potentials in isolated cerebellar Purkinje neurons. *J. Neurosci.*, 19, 1663-1674.
- Ren, K. & Dubner, R. 2002. Descending modulation in persistent pain: an update. *Pain*, 100, 1-6.
- Ren, K., & Dubner, R. 2009. Descending control mechanisms. In Basbaum, A. I. and Buschnell C. (eds), *Science of Pain*, Elsevier, Oxford, pp. 723-762.
- Ribeiro-da-Silva, A. & Coimbra, A. 1982. Two types of synaptic glomeruli and their distribution in laminae I-III of the rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, 209, 176-186.
- Ribeiro-da-Silva, A. 2004. Substantia gelatinosa of spinal cord. In Paxinos, G. (Ed.), *The Rat Nervous System*, 3rd ed. *Elsevier/Academic Press*, New York.
- Robinson, R. B. & Siegelbaum, S. A. 2003. Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu. Rev. Physiol.*, 65, 453-480.
- Robinson, R. B., Yu, H., Chang, F. & Cohen, I. S. 1997. Developmental change in the voltage-dependence of the pacemaker current,  $I_f$ , in rat ventricle cells. *Pflügers Arch.*, 433, 533-535.
- Sagar, S. M., Sharp, F. R. & Curran, T. 1988. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science*, 240, 1328-1331.
- Santoro, B., Grant, S. G. N., Bartsch, D. & Kandel, E. R. 1997. Interactive cloning with the SH3 domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to Eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 14815-14820.
- Santoro, B., Liu, D. T., Yao, H., Bartsch, D., Kandel, E. R., Siegelbaum, S. A. & Tibbs, G. R. 1998. Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell*, 93, 717-729.
- Santoro, B. & Tibbs, G. R. 1999. The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. *Ann. NY Acad. Sci.*, 868, 741-764.
- Santoro, B., Chen, S., Luthi, A., Pavlidis, P., Shumyatsky, G. P., Tibbs, G. R. & Siegelbaum, S. A. 2000. Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *J. Neurosci.*, 20, 5264-5275.
- Scroggs, R. S., Todorovic, S. M., Anderson, E. G. & Fox, A. P. 1994. Variation in IH, IIR, and ILEAK between acutely isolated adult rat dorsal root ganglion neurons of different size. *J. Neurophysiol.*, 71, 271-279.
- Shin, K. S., Rothberg, B. S. & Yellen, G. 2001. Blocker state dependence and trapping in hyperpolarization-activated cation channels: evidence for an intracellular activation gate. *J. Gen. Physiol.*, 117, 91-101.
- Siegenbeek van Heukelom, J. 1991. Role of the anomalous rectifier in determining membrane potentials of mouse muscle fibres at low extracellular  $K^+$ . *J. Physiol.*, 434, 549-560.
- Southan, A. P., Morris, N. P., Stephens, G. J. & Robertson, B. 2000. Hyperpolarization-activated currents in presynaptic terminals of mouse cerebellar basket cells. *J. Physiol. (Lond.)*, 526, 91-97.
- Spike, R. C., Kerr, R., Maxwell, D. J. & Todd, A. J. 1998. GluR1 and GluR2/3 subunits of the AMPA-type glutamate receptor are associated with particular types of neurons in laminae I-III of the spinal dorsal horn of the rat. *Eur. J. Neurosci.*, 10, 324-333.

- Spike, R. C., Puskar, Z., Sakamoto, H., Stewart, W., Watt, C. & Todd, A. J. 2002. MOR-1-immunoreactive neurons in the dorsal horn of the rat spinal cord: evidence for nonsynaptic innervation by substance P-containing primary afferents and for selective activation by noxious thermal stimuli. *Eur. J. Neurosci.*, 15, 1306-1316.
- Stuart, G. & Spruston, N. 1998. Determinants of voltage attenuation in neocortical pyramidal neuron dendrites. *J. Neurosci.*, 18, 3501-3510.
- Szentágothay, J. 1964. Neuronal and synaptic arrangement in the substantia gelatinosa Rolandi. *J. Comp. Neurol.*, 122, 219-239.
- Takamori, S., Rhee, J. S., Rosenmund, C. & Jahn, R. 2000. Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature*, 407, 189-194.
- Takamori, S., Malherbe, P., Broger, C. & Jahn, R. 2002. Molecular cloning and functional characterization of human vesicular glutamate transporter 3. *EMBO Rep.*, 3, 798-803.
- Todd, A. J., Puskar, Z., Spike, R. C., Hughes, C., Watt, C. & Forrest, L. 2002. Projection neurons in lamina I of rat spinal cord with the neurokinin 1 receptor are selectively innervated by substance P-containing afferents and respond to noxious stimulation. *J. Neurosci.*, 22, 4103-4113.
- Todd, A. J., Hughes, D. I., Polgar, E., Nagy, G. G., Mackie, M., Ottersen, O. P. & Maxwell, D. J. 2003. The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn. *Eur. J. Neurosci.*, 17, 13-27.
- Tokimasa, T. & Akasu, T. 1990. Cyclic AMP regulates an inward rectifying sodium-potassium current in dissociated bull-frog sympathetic neurons. *J. Physiol.*, 420, 409-429.
- Tu, H., Jiang, Y. Q., Liu, F. Y., Xing, G. G., Shi, Y. S., Li, T., Yao, L., Han, J. S. & Wan, Y. 2006. The effects of intrathecal application of ZD7288, an HCN blocker, on mechanical allodynia of neuropathic pain model rats. *Chin. J. Pain Med.*, 12, 228-233.
- Ullens, C. & Tytgat, J. 2001. Functional heteromerization of HCN1 and HCN2 pacemaker channels. *J. Biol. Chem.*, 276, 6069-6072.
- Ulrich, D. 2002. Dendritic resonance in rat neocortical pyramidal cells. *J. Neurophysiol.*, 87, 2753-2759.
- Vargas, G. & Lucero, M. T. 2002. Modulation by PKA of the hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) in cultured rat olfactory receptor neurons. *J. Membr. Biol.*, 188, 115-125.
- Varoqui, H., Schafer, M. K. H., Zhu, H., Weihe, E. & Erickson, J. D. 2002. Identification of the differentiation-associated Na<sup>+</sup>/P<sub>1</sub> transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *J. Neurosci.*, 22, 142-155.
- Wall, P. D. & Melzack, R. 1989. Textbook of Pain. Churchill Livingstone, London.
- Wang, D., Li, Y. Q., Li, J. L., Kaneko, T., Nomura, S. & Mizuno, N. 2000.  $\gamma$ -aminobutyric acid- and glycine-immunoreactive neurons postsynaptic to substance P-immunoreactive axon terminals in the superficial layers of the rat medullary dorsal horn. *Neurosci. Lett.*, 288, 187-190.
- Weinreich, D. & Wonderlin, W. F. 1987. Inhibition of calcium-dependent spike afterhyperpolarization increases excitability of rabbit visceral sensory neurons. *J. Physiol.*, 394, 415-427.

- Williams, S., Pini, A., Evan, G. & Hunt, S. P. 1989. Molecular events in the spinal cord following sensory stimulation. In *Processing of Sensory Information in the Superficial Dorsal Horn of the Spinal Cord* (eds Cervero F., Bennett G. J. and Headley P. M.), *NATO ASI Series*, pp. 273-284. Plenum, New York.
- Williams, S. R. & Stuart, G. J. 2000. Site independence of EPSP time course is mediated by dendritic I(h) in neocortical pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.*, 83, 3177-3182.
- Williams, S. R., Christensen, S. R., Stuart, G. J. & Hausser, M. 2002. Membrane potential bistability is controlled by the hyperpolarization-activated current I(h) in rat cerebellar Purkinje neurons in vitro. *J. Physiol.*, 539, 469-483.
- Willis, D. W. Jr & Coggeshall, R. E. 2004. *Sensory Mechanisms of the Spinal Cord*. *Kluwer Academic/Plenum*, New York.
- Woolf, C. J. & Salter, M. W. 2000. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*, 288, 1765-1769.
- Xue, T., Marban, E. & Li, R. A. 2002. Dominant-negative suppression of HCN1- and HCN2-encoded pacemaker currents by an engineered HCN1 construct: insights into structure-function relationships and multimerization. *Circ. Res.*, 90, 1267-1273.
- Yang, K., Wang, D. & Li, Y. Q. 2001. Distribution and depression of the GABA<sub>B</sub> receptor in the spinal dorsal horn of adult rat. *Brain Res. Bull.*, 55, 479-485.
- Yao, H., Donnelly, D. F., Ma, C. & LaMotte, R. H. 2003. Upregulation of the hyperpolarization-activated cation current after chronic compression of the dorsal root ganglion. *J. Neurosci.*, 23, 2069-2074.
- Yu, H., Chang, F. & Cohen, I. S. 1993. Phosphatase inhibition by calyculin A increases  $i_f$  in canine Purkinje fibers and myocytes. *Pflügers Arch.*, 422, 614-616.
- Yu, H., Wu, J., Potapova, I., Wymore, R. T., Holmes, B., Zuckerman, J., Pan, Z., Wang, H., Shi, W., Robinson, R. B., El-Maghrabi, M. R., Benjamin, W., Dixon, J., McKinnon, D., Cohen, I. S. & Wymore, R. 2001. MinK-related protein 1: a  $\beta$  subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation. *Circ. Res.*, 88, E84-87.
- Yu, X., Duan, K. L., Shang, C. F., Yu, H. G. & Zhou, Z. 2004. Calcium influx through hyperpolarization-activated cation channels (I<sub>h</sub> channels) contributes activity-evoked neuronal secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 1051-1056.
- Zagotta, W. N., Olivier, N. B., Black, K. D., Young, E. C., Olson, R. & Gouaux, E. 2003. Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature*, 425, 200-205.
- Zolles, G., Klocker, N., Wenzel, D., Weisser-Thomas, J., Fleischmann, B. K., Roeper, J. & Fakler, B. 2006. Pacemaking by HCN channels requires interaction with phosphoinositides. *Neuron*, 52, 1027-1036.

## 8. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

*Az értekezés alapjául szolgáló in extenso közlemények*

- Antal, M., **Papp, I.**, Niyazi, B., Veress, G. & Vereb, Gy. 2004. Expression of hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated cation channel subunit 2 in axon terminals of peptidergic nociceptive primary sensory neurons in the superficial spinal dorsal horn of rats. *Eur. J. Neurosci.*, 19, 1336-1342. **IF.: 3.820**
- Papp, I.**, Szűcs, P., Holló, K., Erdélyi, F., Szabó, G. & Antal, M. 2006. Hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated cation channel subunit 2 ion channels modulate synaptic transmission from nociceptive primary afferents containing substance P to secondary sensory neurons in laminae I-IIo of the rodent spinal dorsal horn. *Eur. J. Neurosci.*, 24, 1341-1352. **IF.: 3.709**
- Papp, I.**, Holló, K. & Antal, M. Plasticity of hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated cation channel subunit 2 expression in the spinal dorsal horn in inflammatory pain. *Eur. J. Neurosci.* (Közlésre beküldve)

**Független idézetek száma: 15**

**Összesített impakt faktor: 7.529**

*Az értekezés témájához kapcsolódó kongresszusi absztraktok*

- Papp, I.**, Veress, G., Niyazi, B., Vereb, Gy., Antal, M.: Expression of hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated cation channel subunit 2 in axon terminals of peptidergic nociceptive primary sensory neurons in the superficial spinal dorsal horn of rats. IBRO International Workshop, Budapest, 2004, *Clinical Neurosci.*, 57. 1. 2004.
- Antal M., Veress G., **Papp I.**: Postsynaptic targets of peptidergic nociceptive primary afferents that express hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated cation channel subunit 2 in laminae I-IIo of the rat spinal dorsal horn. FENS Forum of European Neuroscience, 2004, Abstr., 4, 189, 2004.
- Papp, I.**, Veress, G., Antal, M.: Presynaptic properties and postsynaptic targets of peptidergic nociceptive primary afferents that express HCN channel subunit 2 in laminae I-II of the spinal dorsal horn in rats. Magyar Idegtudományi Társaság Kongresszusa, Pécs, 2005, *Clinical Neurosci.*, 58. 1. 2005.
- Antal M., Szűcs P., Holló K., Veress G., Erdélyi F., Szabó G., **Papp I.**: HCN2 channels modulate synaptic transmission from peptidergic nociceptive primary afferents to secondary sensory neurons in laminae I-IIo of the rat spinal dorsal horn. Society of Neuroscience, Abstr., 171.8, 2005.
- Papp, I.**, Antal, M.: Expression of HCN2 ion channels in the superficial spinal dorsal horn of rats in Freund's adjuvant-induced inflammatory pain condition. Magyar Idegtudományi Társaság Kongresszusa, Szeged, 2007, *Clinical Neurosci.*, 60. 1. 2007.
- Papp, I.**, Holló, K., Hegedűs, K., Antal, M.: Freund's adjuvant-induced inflammation increases the expression of HCN2 ion channels in the superficial spinal dorsal horn of rats. FENS Forum of European Neuroscience, Genf, 2008, Abstr., 4, 124.27, 2008.

**Papp, I.**, Holló, K., Hegedűs, K., Antal, M.: Overexpression of HCN2 ion channels in the superficial spinal dorsal horn of rats in Freund's adjuvant-induced inflammatory pain. Magyar Idegtudományi Társaság Kongresszusa, Budapest, 2009, *Frontiers in Systems Neuroscience. Conference Abstracts: 12<sup>th</sup> Meeting of the Hungarian Neuroscience Society*. Doi: 10.3389/conf.neuro.01.2009.04.037, 2009.

*Egyéb kongresszusi absztraktok*

Holló, K., Bakk, E., Hegedűs, K., **Papp, I.**, Nagy, L. Antal, M.: The application of the TaqMan Low Density Array (TLDA) method for the investigation of gene expression in pain processing areas of the nervous system. IBRO International Workshop, Debrecen, 2008, *Clinical Neurosci.*, 61. 1. 2008.

Holló K., Bakk, E., Hegedűs K., **Papp, I.**, Bardóczy, Zs., Nagy, L., Antal, M.: Screening of altered mRNA expression in the Freund's adjuvant-induced pain model by the TaqMan low density array (TLDA) method. FENS Forum of European Neuroscience, Genf, 2008, Abstr., 4, 189.16, 2008.

## **9. TÁRGYSZAVAK**

HCN2 ioncsatornák, immunhisztokémia, nociceptív primer afferensek, gerincvelői hátsó szarv, szinaptikus jelátvitel, P-anyag, teljes Freund-adjuváns által kiváltott gyulladás, krónikus fájdalom, patkány

Keywords: HCN2 ion channels, immunohistochemistry, nociceptive primary afferents, spinal dorsal horn, synaptic transmission, substance P, complete Freund's adjuvant induced inflammation, chronic pain, rat

## 10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Kutatásaimat a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetében végeztem, és ezúton szeretném megköszönni az Intézet korábbi és jelenlegi intézetvezető professzorának, Dr. Székely György akadémikusnak és Dr. Antal Miklós egyetemi tanárnak a lehetőséget, hogy bekapcsolódhattam az intézet színvonalas kutatómunkájába. Köszönettel tartozom az intézet valamennyi munkatársának támogatásukért és biztatásukért.

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Antal Miklós egyetemi tanárnak, aki kutatásaimhoz kiváló szakmai útmutatást és segítséget nyújtott. Köszönet azoknak a jelenlegi és volt közvetlen munkatársaimnak, akik az értekezésem alapjául szolgáló kutatómunkához kiváló szakértelmükkel és önzetlen segítségükkel hozzájárultak: Dr. Holló Krisztina, Dr. Szűcs Péter, Varga Józsefné (Marcsi), Bakk Erzsébet, Hegedűs Krisztina, Dr. Laczkó Jenőné, Miklósné Durkó Ágnes, Nagy Ágnes és Dr. Veress Gábor.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Vereb Györgynek a konfokális mikroszkópos vizsgálatokban nyújtott segítségéért, illetve Dr. Szabó Gábornak és Dr. Erdélyi Ferencnek azért, hogy a kísérletekben szereplő transzgenikus állatokat rendelkezésünkre bocsátották.

Ezenkívül őszinte szeretettel köszönöm Szüleimnek, hogy lehetővé tették továbbtanulásomat, illetve családom minden tagjának támogatását és bátorítását. Végül, de nem utolsósorban köszönöm Férjemnek azt a kitartást és türelmet, amivel hozzájárult értekezésem elkészüléséhez.

## 11. FÜGGELÉK