

**SUBSTANCE P ÉS NEUROKININ-1 RECEPTOR INTERAKCIÓ
VIZSGÁLATA KOMBINÁLT ELEKTROFIZIOLÓGIAI ÉS MORFOLÓGIAI
MÓDSZEREKKEL PATKÁNY HÁTSÓ GYÖKI GANGLIONBAN ÉS
GERINCVELŐBEN**

Dr. Szűcs Péter

Témavezető: Prof. Dr. Antal Miklós

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ANATÓMIA, SZÖVET- ÉS FEJLŐDÉSTANI INTÉZET
DEBRECEN, 2003

BEVEZETÉS

A tachykinin családba tartozó, 11 aminosavból álló substance P (SP) fontos szerepet tölt be a fájdalom információ gerincvelői szintű feldolgozásában. A SP az A δ - és C- típusú primér afferensek pl. perifériás fájdalomingerre bekövetkező aktivációjakor, azok centrális terminálisaiból szabadul fel. A felszabaduló SP a gerincvelő hátsó szarvában aktiválja az itt található neuronokat, az első sorban az I-es, III-a és IV-es Rexed féle laminákban expresszált specifikus neurokinin (NK) receptoron keresztül. Krónikus fájdalom (pl. gyulladás) esetén a nagy mennyiségben felszabaduló SP ezen sejtek tartós aktivációjával hozza létre az ún. centrális szenzitizáció jelenségét. Az NK receptoroknak a mai napig három fajtája ismert, ezek közül a SP legnagyobb affinitással a G-protein kapcsolt NK1 receptorhoz kötődik. Az NK1 receptorok aktiválása a másodlagos érző neuronokon hosszantartó depolarizációt eredményez.

A gerincvelői neuronok mellett a SP közvetlenül képes aktiválni a primér afferensek egy részét is, amint azt felnőtt patkányok és tengerimalacok hátsó gyöki ganglionsejtjein (DRG) végzett kísérletek igazolták.

Az NK1 receptorok és a SP eloszlását, az őket expresszáló illetve tartalmazó neuronok morfológiáját kiterjedten vizsgálták felnőtt állatok gerincvelőjében, ugyanakkor viszonylag kevés adat áll rendelkezésünkre arra vonatkozólag, hogy fiatal állatok idegrendszerének e területein milyen a receptornak és ligandjának megoszlása. A kérdés vizsgálatát megkönnyíti, hogy az elmúlt két évtizedben a neurobiológiai kutatásokban egyre nagyobb teret nyertek a különböző elektrofiziológiai módszerek, köztük a vizualizált túlélő agyszelet preparátumon végzett kísérletek. A szeletpreparátumok készítéséhez főleg fiatal állatok használhatók fel, mivel az idősebb állatokban a fejlődés során az egyre előrehaladottabb myelinizáció miatt a szokásos DIC optikával történő vizsgálat és maga a preparátum készítése is nehezebbé válik.

Célkitűzéseink a következők voltak:

1. Fiziológiai, morfológiai és farmakológiai módszerekkel tanulmányozni kívántuk fiatal patkányok hátsó gyöki ganglion sejtjeinek NK1 receptor expresszióját és a receptorok aktiválhatóságát SP-vel. Meg kívántuk határozni, hogy reagálnak-e a DRG sejtek SP hatására és azt, hogy vannak-e eltérések a különböző DRG sejtpopulációk SP-re adott válaszában.
2. Immunhisztokémiai módszerek alkalmazásával meg kívántuk vizsgálni, hogy fiatal patkányok lumbális gerincvelőszakaszán milyen módon helyezkednek el az NK1 receptorok, mennyiben egyezik meg ez a mintázat a felnőtt állatokban leírtakkal, azaz a fiatal állatokon végzett kísérletek eredményei mennyire illeszkednek be a felnőtt állatokon kapott adatok közé?
3. Korábbi irodalmi adatok és az NK1 receptor immunreaktivitás eloszlásának vizsgálatát célzó saját kísérleteink egyaránt arra utaltak, hogy a mélyebb laminák, így köztük az intermedier szürkeállomány bizonyos sejtjei sejttestjeiken NK1 receptort expresszálnak. Ezek a sejtek közvetlenül nem vesznek részt a fájdalominformáció feldolgozásában, ugyanakkor lokális posztszinaptikus célsejtjei lehetnek a nociceptív ingerfeldolgozás elsővonalbeli sejtjeinek. Célszerűnek látszott ezért az ezen a területeken elhelyezkedő neuronok kombinált morfológiai és fiziológiai módszerekkel történő vizsgálata, hogy további adatokat gyűjtsünk a lokális interneuronhálózatokat felépítő idegsejtek összeköttetéseiről.
4. Meg kívántuk vizsgálni, hogy van-e direkt vagy indirekt hatása a SP-nek a mélyebb gerincvelői laminákban, az irodalom által már korábban leírt és a mi kísérleteinkben is igazolt NK1 receptorokon, illetve azt, hogy befolyásolja-e a SP a fájdalominformáció feldolgozásában közvetlenül részt nem vevő sejteket is?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Preparátumok

Az enfluránnal altatott 14 napos Wistar patkányok L4-es DRG-it ventralis feltárásból, jéghideg, 95%/5% arányú O₂/CO₂ keverékkel oxygenizált mesterséges agy-gerincvelői folyadékban (ACSF), 10-13 mm perifériás ideggel és a hozzátartozó hátsó gyökérrel együtt eltávolítottuk. Az ACSF összetétele a következő volt (mmol/l): NaCl, 130; KCl, 3,5; NaH₂PO₄, 1,25; NaHCO₃, 24; CaCl₂, 1,2; MgCl₂ 1,2, glükóz 10 (pH: 7,4). Az immunhisztokémiai kísérletekhez szükséges gerincvelő eltávolítása előtt, a patkányokat enfluránnal végzett mély altatásban transzkardiálisan perfundáltunk fiziológiás sóoldattal, majd ezt követően 4%-os paraformaldehiddel (0,1mol/l foszfát-pufferben (PB), pH: 7,4). A szeletpreparátumok készítéséhez újszülött és fiatal Wistar patkányokat (posztnatális 0-8 nap) használtunk. Az állatokat mély altatásban dekapitáltuk, majd ezt követően eltávolítottuk a lumbális gerincvelőszakaszt. A preparálás minden lépése jéghideg, 95%/5% O₂/CO₂ gázkeverékkel folyamatosan átáramoltatott ACSF-ben (pH: 7,4) zajlott. Az L4-5-ös szegmentumokat kimetsztük, agarba ágyasztuk és Vibratome segítségével 3-400 mikrométer vastag szeleteket készítettünk belőlük.

Immunhisztokémia és morfológiai kiértékelés

A paraformaldehid fixálást (4% paraformaldehid 0,1mol/l PB-ben; pH: 7,4) követően a DRG-kat 50%-os alkohollal tártuk fel 45 percig. A blokkolást 50 percen keresztül végeztük 1%-os normál kecske szérummal (NGS, Vector). Ezután metszeteinket 72 órán át inkubáltuk poliklonális, nyúlban termelt anti-NK1 receptor antitesttel (#11886-5, Dr. S. Vigna ajándéka, 1:40000). A metszeteket ezután biotinilált nyúl ellenes kecske szérumban (biot-GAR, Vector, 1:200) inkubáltuk, amit 1 órás avidin-biotin peroxidáz komplexben történő kezelés követett (ABC, Vector, 1:100). Az immunreakciót nikkel intenzifikált diamino-benzidin (DAB) kromogén reakcióval tettük láthatóvá (0,05%-s DAB és 0,01%-os H₂O₂ 0,05mol/l Tris pufferben, pH: 7,4). A metszeteket ezután zselatinos tárgylemezre szedtük fel és levegőn megszáritottuk. Száradás után a metszeteket krezil ibolyával halványan háttérfestettük, víztelenítettük és szintetikus lefedő anyaggal (DPX, Fluka, Buchs, Svájc) fedtük. A jelölődött sejteket camera lucida segítségével tanulmányoztuk és rajzoltuk ki, majd az adatokat NeuroBuild számítógépes szoftverrel analizáltuk.

A gerincvelő esetében az L4-es szakasz kimetszése után hasonlóan jártunk el mint a DRG esetében. Az immunopozitív sejtek arányának számszerű meghatározásához 14 napos patkány gerincvelő Nissl-festett harántmetszetéből származó teljes sejtszámot használtunk.

A gerincvelői szeletpreparátumból történő regisztrálás után a szeleteket fixálóba (4% paraformaldehid, 1,25% glutáraldehid és 0,2% pikrinsav 0,1mol/l PB-ben) raktuk 1-4 napra, majd a szeletekből 60 mikrométer vastag metszeteket készítettünk Vibratome segítségével. Az regisztrálás során a neuronba diffundáló biocytin kimutatásához a metszeteinket avidin-biotin tormaperoxidáz módszerrel kezeltük (Extravidin, 1:1000, Vector, Burlingame, CA, USA) és a hisztokémiai reakciót DAB (Sigma, St. Louis, MO, USA) chromogén reakcióval tettük láthatóvá. A metszeteket ezt követően toluidin kékkel háttérfestettük, hogy megkönnyítsük a laminák szerinti elrendeződés megállapítását, majd dehidráltuk, DPX segítségével lefedtük és Neurolucida (Microbrightfield Inc., Villiston, VT, USA) segítségével három dimenzióban rekonstruáltuk őket.

Elektrofiziológiai mérések

Az elektrofiziológiai mérésekre használt DRG-kat egy oxigenizált ACSF-el folyamatosan átáramoltatott (1,5ml/min), szobahőmérsékletű, Sylgarddal bélelt mérőkádba tűztük. A hátsó gyökeret regisztráló, a perifériás ideget stimuláló szívó elektródába húztuk. Az extraelluláris potenciálok erősítésére Axoclamp 2A erősítőt (Axon Instruments, Union City, CA, USA) használtunk. A DRG-kon 30 másodpercig áramoltattunk át SP-t (1 μ mol/l, Sigma). Alapos kimosást követően egy NK1 receptor szelektív nem-peptid antagonistát, az RP67580 (1 μ mol/l, Rhone Poulenc Rorer Inc., Franciaország) 15 percig történő perfúziója után megismételtük a SP applikációt a preparátumon.

Az intracelluláris mérésekhez a DRG-kat az elektrofiziológiai mérés előtt 5 percig kollagenázzal kezeltük, hogy eltávolítsuk a gangliont borító capsulát. A perifériás ideget szívóelektródába húzva a DRG sejteket egyes impulzusokkal (0-100V, 20-200 μ s, ST-02 stimulátor, Experimetria, Budapest) ingereltük. Az intracelluláris mérésekhez kálium-acetáttal (2mol/l) töltött boroszilikát mikroelektródákat (60-80M Ω) használtunk. A feszültségjelek erősítéséhez Axoclamp 2A (Axon Instruments, Union City, CA, USA) erősítőt alkalmaztunk. A vezetési

sebesség kiszámításakor a stimuláló és a regisztráló elektróda közötti távolságot a stimuláló artefaktum és az akciós potenciál kezdete között eltelt idővel osztottuk el.

A gerincvelői szeletekben vizsgálni kívánt sejteket egy 40x-es nagyítású vízimmerziós, DIC filterrel ellátott objektív segítségével, egy videomonitorhoz kötött infravörös tartományban érzékeny CCD kamera (Hamamatsu, Japán) biztosította vizuális kontroll mellett választottuk ki. Konvencionális teljes-sejt patch-clamp elvezetéseket végeztünk current-clamp üzemmódban, 4-7M Ω ellenállású boroszilikát kapillárisból húzott elektródákkal Axopatch 1D, Axopatch 200B illetve Axoclamp 2B (Axon Instruments, Union City, CA, USA) erősítők segítségével. Az elektródák megtöltésére használt ún. intracelluláris oldat az alábbiakat tartalmazta (mmol/l): K-glukonát, 126; KCl, 4; ATP, 4; GTP, 0,3; foszfo kreatin, 10; HEPES, 10 és 0,5% biocytin (Sigma, St. Louis, MO, USA) (pH:7,2). A sejtek ún. tüzelési mintázatát 800ms hosszú egyre növekvő (-30pA-100pA) amplitúdójú áramimpulzusok alkalmazásával határoztuk meg. A neuronok kapacitását és soros ellenállását nem kompenzáltuk. Az elvezetések szobahőmérsékleten történtek.

A kísérletek során alkalmazott minden farmakológiai ágenszt az átáramoltatott ACSF-hez adtuk hozzá amit vagy egy perisztaltikus pumpa, vagy pedig gravitációs perfúziós rendszer segítségével juttattuk a mérőkádba (1,5-2 ml/min).

Az adatokat 5kHz-en szűrve egy Digidata 1320 AD/DA konverter és a pClamp 8.0 szoftver (Axon Instruments, Union City, CA, USA) segítségével digitalizáltuk IBM kompatibilis PC-n. A mérési eredményeket a Clampfit 8.0, Origin (Microcal Software, Northampton, MA, USA), Whole Cell Program valamint az Electrophysiology Data Recorder (Dr. J. Dempster, University of Strachlyde, Glasgow, Egyesült Királyság) szoftverek segítségével analizáltuk. A görbék illesztését a Clampfit 8.0 szoftver (Axon Instruments, Union City, CA, USA) beépített iteratív Levenberg-Marquadt algoritmusának segítségével végeztük el. Minden numerikus adatot "átlag $\pm$ standard hiba" formában fejeztünk ki. Az adatok statisztikai analizisét Student féle *t*-próbával és ANOVA-val végeztük.

EREDMÉNYEK

Hátsó gyöki ganglionsejtek SP érzékenysége

A véletlenszerűen választott DRG metszetek mindegyikén, a metszetek teljes mélységében, egyenletes eloszlásban meg volt figyelhető NK1 receptor immunopozitivitás. A jelölt neuronok nem mutattak semmilyen szembeötlő elrendeződést, bár esetenként több jelölt sejt kisebb csoportokba rendeződött. Az immunopozitív sejtek általában membránjukon jelölődtek, rendszerint szakaszos jelleggel. Alkalmanként a sejttesten belül is megfigyelhető volt jelölés és néhány sejten a szómából kiinduló immunopozitív nyúványok is láthatóak voltak. Az epi-, peri- és endoneurium területén néhány apró ovális sejt ugyancsak immunopozitívnak tűnt. A kontroll kísérletekben nem kaptunk jelölést a metszetekben.

A véletlenszerűen kiválasztott metszeteken kirajzolt ganglionsejtek tanulmányozása és megszámlálása után a ganglionsejtek $32 \pm 1,5\%$ -a (22,2–37,6%) bizonyult immunopozitívnak. A pozitív sejtek többsége a kis-közepes átmérőtartományba tartozott (10-30 μm). Az NK1 receptor immunopozitív ganglionsejt populáció átmérőjének átlaga $28 \pm 0,3 \mu\text{m}$ (n=799) volt.

A DRG-kon a 30 másodpercen át tartó SP (1 $\mu\text{mol/l}$) perfúzió egy hosszantartó, elnyújtott depolarizációt váltott ki, amelynek átlagos amplitúdója $320 \pm 49,7 \mu\text{V}$ (200-600 μV), átlag időtartama (az alapvonalhoz való visszatérésig) pedig $248 \pm 9,7\text{s}$ (162-297s) volt (n=18). A kísérletek során az ismétlődő SP alkalmazások nem okoztak a preparátumban nyilvánvalóan megfigyelhető deszenzitizációt. Az RP 67580 (1 $\mu\text{mol/l}$), nem-peptid NK1 receptor antagonistá, a SP által kiváltott válasz amplitúdóját csak kismértékben csökkentette. Az antagonistá magasabb koncentrációkban sem okozott nagyobb mértékű csökkenést. Az amplitúdó átlagos csökkenése $23 \pm 2,5\%$ volt (n=4).

A SP hatásának tanulmányozására alkalmas stabil elvezetéseket 29 neuronból sikerült nyernünk. A DRG neuronok karakterizálására az ideg-impulzusok vezetési sebességét használtuk. A sejteket 2,6 m/s feletti rostvezetési sebesség esetén A α / β -csoportba, 0,8-2,6 m/s közötti vezetési sebesség esetén az A δ -, míg 0,8 m/s alatti értékek esetében a C-típusba soroltuk. Ezen kritériumok alapján szétválasztva, 10 A α / β -, 11 A δ - és 8 C-típusú sejt SP érzékenységét vizsgáltuk. A vizsgált neuronok

aktív és passzív membránparaméterei megfeleltek az adott DRG neuron típusnak és arra jellemzőek voltak.

Az alkalmazott SP (1 μ mol/l) nem volt hatással az A α / β sejtek membránparamétereire (n=10), ugyanakkor a 11-ből 4 A δ neuron- és a 8-ból 2 C-típusú DRG neuron esetében reverzibilis depolarizációt, illetve tüzelést okozott. A depolarizáció átlagos amplitúdója 5,6 $\pm$ 1,3 mV (n=4), átlagos időtartama 158 $\pm$ 3,9s (n=4) volt.

NK1 receptor eloszlása fiatal patkány gerincvelőben

A legerősebb NK1 receptor immunoreaktivitás az I-es laminában volt megfigyelhető. Sejttestek és rostok egyaránt intenzíven jelölődtek ezen a területen. A laminára jellemzőek voltak a szürkeállomány dorsális szélével párhuzamosan futó vastag dendritok. Ebben a laminában a jelölt sejtek nagy többsége két sejttypusba tartozott. A kis kerek sejttestű neuronok (76,1%) a "fusiform" sejtek csoportjába, míg a jelölt sejtek körülbelül 20%-át adó hosszú, a fehér-/szürkeállomány határral párhuzamos dendritokkal bíró neuronok a multipoláris sejtek csoportjába tartoztak.

A II-es laminában az immunreakció nem mutatott homogén eloszlást. Míg a lamina laterális része praktikusán üres volt, addig a középső/mediális rész enyhe jelölődést mutatott. A lamina neuronjainak összességében 2-3%-a jelölődött és ezen sejtek 80%-a kicsiny elnyújtott sejt volt. Ezek a sejtek morfológiai jegyeik alapján (dorsalisán és ventralisan kiinduló dendritok) "stalked" sejteknek feleltek meg. A pozitív neuronok 10%-a "islet" sejtekre emlékeztető sejt volt, kicsi kerek sejttesttel, amik a transzverzális síkban nem rendelkeztek dendritokkal. A fentmaradó immunopozitív sejtek száma alacsony volt, de jellemzőek voltak a II-es laminára. Ezek a neuronok nagy multipoláris sejttesttel bírtak, dendritjeik általában a sejttesttől messzire is követhetők voltak és az I-es, a III-as vagy a IV-es laminák felé tartottak, a morfológiai jellegzetességeik alapján Cajal "transverseoux" sejtjeinek illetve Beal nagy centrális sejtjeinek feleltek meg.

A III-as és IV-es lamina gazdag immunopozitív rosthálózatot tartalmazott, legsűrűbben a IV-es lamina mediális részében. A III-as lamina sejtjeinek 4%-a, míg a IV-es lamina neuronjainak 5%-a volt immunopozitív, és a jelölt sejtek két fő sejttypushoz tartoztak. A III-as lamina pozitív sejtjeinek 90%-a kerek vagy multipoláris sejttaggal bírt és dendritjeik nem léptek be felületesebb laminákba, bár

arrafelé indultak. Ezen ismérvek alapján centrális sejteknek kategorizáltuk őket. Az immunopozitív III-as lamina beli sejtek fenmaradó 10%-a antenna sejt volt, multipoláris sejttessel és dorsalis irányba húzódó, a II-es és I-es laminát mindig elérő dendritekkel. A IV-es laminában a centrális sejtek 65%-os míg az antennasejtek 35%-os arányban képviseltették magukat a jelölt sejtek között.

Az V-VII-es laminák immunoreaktivitása egységes és relatíve gyenge volt. Az V-ös laminában immunopozitív sejteket a lamina mediális és laterális részében csoprotokba rendeződve találtunk, a VI-os laminában elszórtan helyezkedett el néhány pozitív sejttest, míg a VII-es laminában, a canalis centralistól laterálisan, nagy immunopozitív sejteket tartalmazó sejtcsoportot figyeltünk meg. Ezek a pozitív sejtek általában multipolárisak voltak, a VII-es lamina mediális részén található sejtek kifejezetten nagy számával rendelkeztek, dendritjeik pedig mediolaterális orientációt mutattak.

A VIII-as lamina mutatta a leggyengébb immunoreaktivitást, itt alig találtunk NK1 receptor ellenes antitesttel jelölt sejttesteket.

Habár a IX-es lamina sejtségei körül erős immunopozitív rosthálózatot találtunk, ami a laminának erősebben jelölődött megjelenést biztosított, maguk a sejttestek csak halványan és elszórtan mutattak pozitivitást..

A canalis centralis körül elhelyezkedő X-es lamina halványan jelölt neuronokat és erős immunoreaktivitást mutató rostokat tartalmazott, amelyek sűrű hálózatot formáltak a canalis centralis körül. Az immunopozitív sejttestek kicsik, multipolárisak vagy fusiformisak voltak és zömmel a canalis centralistól dorsalisán helyezkedtek el.

Az V-VI-os lamina és az intermedier szürkeállomány neuronjainak fiziológiai és morfológiai vizsgálata

Kísérleteink során mintegy 70 neuronból sikerült stabil fiziológiai méréseket végeznünk. Az elvezetett szeletek közül 47 esetben volt az elektrofiziológiai regisztrálás mellett a biocytin jelölés is sikeres. A regisztrált sejtek átlagos membránpotenciálja $-51,71 \pm 1,52$ mV volt. A küszöbfeletti depolarizációt okozó áramimpulzusokkal kiváltott tüzelési mintázataik alapján a neuronokat a következő négy csoportba soroltuk: (i) „phasic” sejtek (n=10); (ii) „repetitive” neuronok (n=15); (iii) „single” sejtek (n=9); és „slow” neuronok (n=8). A fentmaradó 5 neuron esetében a tüzelési mintázat egyik csoportba sem illett bele maradéktalanul, mivel ezeknél a

sejteknel mind a „phasic” mind pedig a „repetitive” csoport tüzelésére jellemző tulajdonságok megfigyelhetők voltak.

A „phasic” neuronok a hosszantartó küszöbfeletti depolarizáló impulzusokra folyamatos AP sorozattal válaszoltak, emellett kifejezett AP amplitúdó akkomodációt mutattak, és ezzel párhuzamosan az AP-ok közötti időtartam markáns megnyúlása volt megfigyelhető a 800ms hosszú áramimpulzus alatt. Az AP-ok után rövid monofázisos utóhiperpolarizációk (AHP) voltak megfigyelhetők.

A „phasic” sejtekhez hasonlóan, a „repetitive” neuronok is folyamatos AP sorozattal reagáltak a depolarizáló áramimpulzusra, ugyanakkor, a „phasic” csoport sejtjeivel ellentétben, sem az AP-ok amplitúdójában sem pedig frekvenciájukban nem volt akkomodáció megfigyelhető. Az AP-okat ebben a csoportban mindig lassú, kifejezett monofázisos AHP követte.

A többi sejtípussal ellentétben a „single” neuronok csak egy (néhány esetben kettő) AP-t tüzeltek a küszöbfeletti depolarizációt eredményező négyszögimpulzus ideje alatt és az AP-ok után csak egy kismértékű AHP-t figyeltünk meg.

A „repetitive” csoporthoz hasonlóan a „slow” sejtek is akkomodációt nem mutató, folyamatos AP sorozattal válaszoltak a depolarizáció során, az AP-okat kifejezett, elnyújtott, monofázisos AHP-k követték. Ugyanakkor az AP-ok frekvenciája ($8,9 \pm 0,6$ Hz) szignifikánsan alacsonyabb volt mint a „repetitive” sejtek esetében ($21,83 \pm 1,5$ Hz) ($P < 0.001$).

Statistikai analízis során a nyugalmi membránpotenciál, a bemeneti időállandó, az AP túllövése és félszélessége esetében nem találtunk szignifikáns eltérést a csoportok között. Ugyanakkor a „single” és „slow” neuronok bizonyos paraméterei elkülönítették ezt a két csoportot a többitől és egymástól is. A „single” csoport neuronjai rendelkeztek a legalacsonyabb AP amplitúdóval ($54,44 \pm 4,14$ mV) és túllövessel ($16,84 \pm 6,16$ mV), ugyanakkor a legmagasabb küszöbértékkel is ($-40,94 \pm 5,95$ mV). A „single” csoport esetében az AHP átlagos amplitúdója szintén a legalacsonyabb volt a vizsgált neuronok közül.

Az áram-feszültség görbék vizsgálatakor kitűnt, hogy a legkevésbé meredek görbe a „slow” csoport neuronjait jellemzi, de a „single” neuronok is alacsonyabb értékekkel rendelkeztek, mint a maradék két csoport sejtjei. Ennek megfelelően a „slow” sejteknek volt a legkisebb a bemeneti ellenállása.

A 47 sikeres biocytin-jelölt és rekonstruált neuronból 13 az V-VI-os laminában, míg 34 a VII-es laminában, azaz az intermedier szürkeállományban volt

megtalálható. A membránparaméterekkel megegyezően, a „phasic” és „repetitive” neuronok eloszlása és morfológiai jellemzőik hasonlóak voltak egymáshoz, viszont a „single” és „slow” sejtek csak rájuk jellemző karakterisztikus jegyeket mutattak. A legtöbb „phasic” (10-ből 8) és „repetitív” (15-ből 13) neuron multipoláris sejttesttel, 4-6 törzsdendrittel rendelkezett és az V-VII-es laminákban egyenletesen oszlottak el. A kilenc „single” neuron közül 7 darab az V-VI-os lamina laterális részén volt megtalálható. Ezekben a neuronokban a kis kerek sejttestből 3-5 törzsdendrit indult ki, amelyek hosszú, de szegényesen oszló, dorso-ventralis orientációjú dendritfát alkottak. A vizsgált sejtek közül a „slow” tüzelési mintázattal rendelkező neuronoknak volt a legnagyobb és legelnyújtottab számája. A 8-ból 6 esetben a „slow” sejtek 6-8 törzsdendrittel bírtak, amelyek két csoportba rendeződve a sejt két átellenes pólusán eredtek és egy gazdagon oszló dendritfát alakítottak ki. A többi sejt ellentétben a „slow” neuronok kizárólag a VII-es lamina ventromedialis részén voltak megtalálhatóak. Hét esetben az axon szintén megjelölődött, és vagy a középvonal felé, vagy laterális irányba tartott. Az 5 mediális orientációjú axon közül 4 átlépte a középvonalat a commissura anteriorban és a contralateralis ventrális szürkeállományban végződött, míg a laterális irányba induló axonok a laterális motoros oszlop felé tartottak.

A dendritfa oszláspontjainak megoszlását vizsgálva is eltérőnek bizonyultak a „slow” csoport neuronjai a másik három csoportba tartozó neuronoktól. Amíg az első három csoportba tartozó sejtek dendritjei kevés számú elágazási ponttal rendelkeztek és ezek zömmel a sejttest közvetlen környezetében voltak megtalálhatóak, addig a „slow” csoport neuronjainak dendritjei gazdag elágazásrendszerrel bírtak, ami a szómától távolabb is magasabb dendrit oszláspont-számban mutatkozott meg és bokorszerű megjelenést kölcsönzött ezeknek a sejteknek.

Az intermedier szürkeállomány neuronjaira érkező szinaptikus bemenetek SP modulációja

A vizsgált 34 neuron esetében a SP (1 μ mol/l) alkalmazását követő tipikus válaszreakció a sejtmembránon regisztrált EPSP-k számának kifejezett emelkedése volt. Az ismételt SP applikáció hasonló, de kisebb mértékű EPSP szám növekedést váltott ki.

A megfigyelt SP hatást az SR140333 (10nmol/l) nem-petid NK1 receptor antagonistája effektíven blokkolta 11-ből 7 esetben. Az antagonisták kimosását követően a SP ismételt, ekkor már önálló alkalmazása általában nem járt markáns EPSP frekvencia növekedéssel. A [Sar⁹,Met(O₂)¹¹]-SP (50-200nmol/l) potens NK1 receptor agonistával végzett kísérletek során a SP hatásához nagyon hasonló, nagymértékű EPSP-szám növekedés volt megfigyelhető mind a 9 vizsgált sejt esetében.

A továbbiakban arra kerestük a választ, hogy a megnövekedett EPSP szám hátterében a preszinaptikus neuronok tüzelési frekvenciájának SP kiváltotta növekedése, vagy az akciós potenciáltól független transzmitterfelszabadulás (mini-EPSP) áll. A kérdés megválaszolása érdekében megismételtük a SP (1 μ mol/l) applikációt 500nmol/l TTX jelenlétében. A TTX bemosását követően a kezdeti EPSP-szám lecsökkent és azt a SP applikáció nem befolyásolta.

Neuronjainkat a korábbi kísérleteink során megfigyelt tüzelési mintázatok szerint csoportokra osztva, az 1 μ mol/l SP applikáció során a három megfigyelt tüzelési mintázat csoportba tartozó összes neuron (n=11) bemeneti ellenállása lecsökkent. Legmarkánsabb a „repetitive” csoportba tartozó sejtek esetében volt ez a csökkenés, ahol következményesen a tüzelési mintázat is változott. Míg a „phasic” és „slow” csoportban ez a hatás reverzibilisnek bizonyult, addig a „repetitive” csoport neuronjainak ellenállása irreverzibilisen megváltozott a SP alkalmazását követően

MEGBESZÉLÉS

Hátsógyöki ganglionsejtek SP érzékenysége

Az értekezésben bemutatott eredményeink arra engednek következtetni, hogy fiatal patkányok DRG neuronjainak egy szub-populációja funkcionális NK1 receptorokat expresszál. Mivel immunhisztokémiai eredményeink fiatal állatokból származtak és korábbi in vitro DRG preparátumokon végzett elektrofiziológiai kísérletek eredménye alapján az intracelluláris elvezetések is stabilabbak fiatal állatokból származó preparátumokon, ezért a kísérletsorozatot kizárólag fiatal patkányokon végeztük.

A jelen kísérletekben használt NK1 receptor ellenes antitest a receptormolekula C-terminálisának 15 aminosavnyi szekvenciájára specifikus. Ezt az antitestet alkalmazták korábban gerincvelőben, nucleus trigeminalis caudalis-ban, felnőtt patkány DRG-ban illetve perifériás idegben. Annak ellenére, hogy a gerincvelőben nagyszámú NK1 receptort mutattak ki az antitesttel, felnőtt patkány DRG-ben nem találtak immunreaktivitást. Ez a mi adatainkhoz képest eltérő eredmény többféleképpen magyarázható. A DRG neuronok NK1 receptor expressziója a posztnatális fejlődés során csökkenhet, mint ahogy azt számos -köztük az NK1-receptor esetében megfigyelték. A DRG-n belüli immunoreaktivitás csökkenést a receptornak a fejlődés során a szómárol a perifériás és centrális terminálisokba való transzlokációja is eredményezheti.

Kísérleteinkben a teljes DRG sejtpopuláció 1/3-a mutatott NK1 receptor immunopozitivitást, míg intracelluláris elvezetéssel a neuronok 1/5-e bizonyult SP-vel aktiválhatónak. Immunhisztokémiai eredményeink jó összhangban vannak a korábbi leírások többségével, amik szerint a DRG neuronok 30-40%-a érzékeny SP-re.

Vizsgálatainkban az NK1 receptor immunopozitív neuronok többsége a közepes-kis mérettartományba esett. Összehasonlító morfológiai és fiziológiai vizsgálatok alapján a közepes és kis DRG neuronok A δ - és C- típusúak. Kísérleteinkben mi is A δ - és C- típusú neuronokban figyeltünk meg depolarizációt illetve tüzelést SP hatására.

A szelektív és hatékony NK1 receptor antagonistá RP67580 csak mintegy 25%-kal csökkentette a hátsó gyökéren SP-vel kiváltott depolarizáció amplitúdóját. Újabb irodalmi adatok szerint ugyanakkor a DRG neuronok egy szub-populációja az

összes NK receptor típuson keresztül aktiválható. Bár a SP legnagyobb affinitással az NK1 receptorhoz kötődik, képes aktiválni az NK2 és NK3 receptorokat is. Ennek megfelelően elképzelhető, hogy a SP kiváltotta válasz RP67580 nagy koncentrációja által sem befolyásolt részéért a DRG sejtek NK2 és NK3 receptorok révén megvalósuló aktivációja felelős.

A funkcionális NK1 receptorok jelenléte a DRG neuronokon szükségszerűen felveti élettani jelentőségük kérdését. Az egyik lehetőség, hogy a szenzoros ganglionokon belül expresszáldó NK1 receptorok magukban a ganglionokban játszanak szerepet a szenzoros információfeldolgozásban. Másrészt elképzelhető, hogy ezen receptorok csak átmenetileg, a perifériás- illetve a centrális terminálisokba való transzportálást megelőzően expresszáldódnak a neuronok szómáján. Más kutatócsoportok korábban nem találtak NK1 receptor immunoreaktivitást a primér afferenseken a gerincvelőben. A mi eredményeink szerint A δ - és C- karakterisztikával bíró DRG neuronok funkcionális NK1 receptorokat expresszálnak. Az a tény, hogy ezen rosttípusok zöme az gerincvelői I-es laminában végződik, ahol a legnagyobb NK1 receptor immunopozitivitás figyelhető meg, további vizsgálatok igényét veti fel.

NK1 receptor immunoreaktivitás fiatal patkányok lumbális gerincvelőjében

Általánosságban elmondható, hogy az általunk fiatal állatokban talált immunopozitivitási mintázat szinte mindenben azonosnak bizonyult a korábban felnőtt patkányokban leírttal. A fiatal patkányokban talált immunopozitív neuronok többsége ugyanazokba a csoportokba tartozik mint a felnőtt állatokban megfigyeltek, bár néhány laminában akadtak kisebb eltérések.

Érdekes eredmény, hogy a mélyebb hátsó szarv és az intermediér szürkeállomány bizonyos területein is megfigyelhetők voltak halványan, de határozottan immunopozitív sejttestek. Korábbi irodalmi adatok hasonló jellegű, főleg neuronok sejttestjein megtalálható NK1 receptor immunopozitivitásról számolnak be felnőtt patkány gerincvelőn, valamint emberi újszülött és felnőtt gerincvelőben egyaránt. Mivel az ezeken a neuronokon elhelyezkedő NK1 receptorok funkciójáról nem sokat tudunk, célul tűztük ki további kísérleteinkben az intermediér szürkeállományban és az V-VI-os laminákban található neuronok fiziológiai és morfológiai karakterizálását, valamint a rajtuk megtalálható NK1 receptorok esetleges szerepének tisztázását.

Az intermedier szürkeállományban és az V-VI-os laminában található neuronok fiziológiai és morfológiai karakterizálása

Általánosan elfogadott tény, hogy az intermedier szürkeállomány és a mellső szarv sejtjei, melyek jelentős része a gerincvelői motoros apparátus részének tekinthető, számos gerincvelői és felsőbb szintű központból származó szinaptikus bemenetet fogadnak és integrálnak. Kísérleteinkben az itt található neuronok membránsajátságainak és morfológiájának megismerésével további adatokat kívántunk szolgáltatni az ezekből a paraméterekből adódó integratív képesség és a neuronok lokális neuronális hálózatokban betöltött szerepének megértéséhez.

Eredményeink arra utalnak, hogy az intermedier szürkeállomány neuronjai morfológiai és elektrofiziológiai paramétereik alapján heterogén populációt alkotnak. Tüzelési mintázataik alapján négy csoportot különböztettünk meg. Korábbi irodalmi adatok már beszámoltak „phasic”, „repetitive” és „single” tüzelési mintázatokról a gerincvelő felszínes és mély hátsó szarvában, valamint hátsó szarvi neurontenyészeteken. Az általunk megfigyelt „slow” mintázat ugyanakkor, legjobb tudomásunk szerint, eddig még nem került leírásra.

Természetesen felmerül a kérdés, hogy mennyiben a neuronok intrinsic sajátossága az általuk küszöbfeletti depolarizáló áramimpulzusokra adott AP sorozat, és mennyiben függ ez a válasz a szeletpreparátumokban általunk is megfigyelt, megtartott működő neuronhálózatok aktivitásától. Ha figyelembe vesszük, hogy neuron-kultúrákon -ahol ilyen komplex neuronhálózatok kialakulása nem, vagy csak hosszú idő után valószínű- ugyanezeket a tüzelési mintázatokat figyelték meg, akkor valószínű, hogy a mintázatok kialakításáért elsősorban a neuronok membránsajátságai és ioncsatorna összetétele felelősek.

A „phasic” és „repetitive” neuronok sem morfológiájukat, sem membránparamétereiket, sem eloszlásukat tekintve nem különíthetők el olyan élesen az V-VII-os laminákban, mint a gerincvelő más területein. Erre utal az a tény is, hogy 5 neuront nem tudtunk sem egyik, sem másik kategóriába sorolni, mivel mind a „phasic”, mind a „repetitive” neuronok karakterisztikus jegyeit mutatták, mintegy átmenetet képezve a két csoport között. Így lehet, hogy ez a két tüzelési mintázat egy heterogén sejtpopuláció két szélsőséges megjelenési formáját képviseli. A gerincvelőben mindenütt megtalálható, ezen két tüzelési mintázatot mutató neuronokat vizsgálva arra a következtetésre jutottak, hogy lassú szinaptikus

potenciálváltozásaikkal és alacsony membrán időállandójukkal ezek a neuronok különösen alkalmasak a szinaptikus bemenetek időbeni szummációjára és integrációjára, valamint a stimulus intenzitásának megfelelő válaszra.

Fentiekkel szemben a „single” sejtek képtelenek a fogadott stimulus erősségének és időtartamának a tüzelési frekvencián keresztüli kódolására, de alkalmasak arra, hogy nagy frekvenciájú (pl. „burst”-ölő neuronok) vagy ritmikus bemeneteket kövessenek válaszaikkal. Ennek megfelelően alkalmasak lehetnek szinaptikus bemenetek aktivitásának detektálására. Vizsgálatainkban a „single” neuronok többségét az V-VI laminákban találtuk meg. Hasonló tüzelési mintázatú neuronokat a felületes és mély hátsó szarvban, különböző típusú primér afferensek végződési zónájában már korábban is leírtak. Ez a tény megengedi a feltételezést, hogy a „single” neuronok szinaptikus bemeneteinek egy része primér szenzoros neuronokból is származhat. Ezt támasztja alá az is, hogy az Ia típusú gátló interneuronok erős beidegzést kapnak primér afferensektől, valamint, hogy ezek az Ia neuronok macska gerincvelőben szintén „single” tüzelési mintázatot mutattak

Az általunk leírt „slow” tüzelési mintázatú sejtek jól elkülönülő membránparaméterekkel (pl. igen alacsony bemeneti ellenállás, kis tüzelési frekvencia) rendelkeztek és sajátos morfológiai jegyeket is mutattak (nagy sejttest, igen kiterjedt és gazdagon elágazó dendritfa), ugyanakkor jellegzetes módon az intermediér szürkeállomány ventromediális részén helyezkedtek el, ott, ahol hasonló morfológiájú neuronok szómáin határozott NK1 receptor immunoreaktivitást figyeltünk meg korábban. Elhelyezkedésük alapján úgy gondoljuk, hogy a „slow” neuronok fontos részét képezhetik a gerincvelő ritmus- illetve mintázatgeneráló hálózatainak, valamint commissurális axon-kollaterálisaikkal részt vehetnek a jobb-bal, illetve flexor-extensor alternáció kialakításában is.

Intermedier szürkeállománybeli neuronok SP érzékenysége

Az a tény, hogy az intermedier szürkeállományban nem regisztráltunk „single” tüzelési mintázatú neuront, jól megfelel korábbi eredményeinknek, miszerint ezek a sejtek inkább az V-VI-os laminákban találhatók meg.

Az NK1 receptorok jelenlétének vizsgálatáról és szerepéről az intermedier szürkeállományban nem sok irodalmi adat áll rendelkezésre. Közel egy évtizeddel ezelőtt néhány közlemény foglalkozott azzal a megfigyeléssel, hogy mellső gyökér regisztrátumokon illetve motoneuronokon végzett intracelluláris elvezetésekben, hátsó gyökér vagy primér afferens stimuláció eredményeképpen kialakuló depolarizáció gátolható NK1 receptor antagonistákkal, (pl. SR140333, RP67580). Ez a megállapítás indirekt utalás volt funkcionális NK1 receptorok jelenlétére a mellső szarv sejtjein, köztük a motoneuronokon.

Ugyanakkor néhány közlemény beszámolt arról, hogy SP pozitív terminálisok sűrű hálózata található bizonyos intermedier szürkeállománybeli neuronok körül patkány L2-4-es szegmentumaiban, illetve SP tartalmú neuronokat és terminálisokat írtak le ezen a területen patkányban, valamint emberi és majom gerincvelőben.

Ezidáig azonban igen kevés közvetlen bizonyíték áll rendelkezésre az intermedier szürkeállományban NK1 receptor immunoreaktivitást eredményező funkcionális NK1 receptorokról. Bemutatott eredményeink három fontos következtetést engednek meg:

1. Az intermedier szürkeállomány neuronjai nagy mennyiségű bemenetet kapnak SP érzékeny neuronoktól, így azok aktivitásának fokozása SP-vel az intermedier szürkeállomány neuronok membránján regisztrált EPSP-k számának nagymértékű megnövekedését idézi elő. Ez a hatás valószínűleg elsősorban NK1 receptoron keresztül valósul meg, mivel az NK1 receptor specifikus antagonistája effektíven gátolta, míg egy hatékony agonista reprodukálta a SP által kiváltott választ. A SP-aktivált preszinaptikus neuronok elhelyezkedésének tisztázása további vizsgálatokat igényel. Lehetséges lokalizációként felmerül a hátsó szarv, valamint maga az intermedier szürkeállomány.
2. A TTX-nal végzett kísérletek eredményei alapján kizárható, hogy AP független transzmitterfelszabadulás (mini EPSP) állna a megnövekedett EPSP szám hátterében. Nem zárható ki ugyan a vizsgált neuronokon végződő terminálisokban található, preszinaptikus NK1 receptorok léte, azonban az immunhisztokémiai

jelölések során ebben a laminában dominánsan sejttestes jelölést kaptunk és nem láttunk rostvégződéseket.

3. A SP applikáció a három regisztrált tüzelési mintázat csoportba tartozó neuronok közül legnagyobb mértékben a „repetitive” sejtek bemeneti ellenállását és tüzelési frekvenciáját változtatta meg. Ez a tény igazolni látszik a funkcionális NK1 receptorok jelenlétét az intermedier szürkeállomány neuronjainak egy részében. Annak a kérdésnek a tisztázása, hogy vajon a funkcionális NK1 receptort expresszáló sejtek egybeesnek-e a „repetitive” csoport neuronjaival, további immunhisztokémiával kombinált elektrofiziológiai kísérletek elvégzését igényli. További vizsgálatokat igényel az a megfigyelés is, hogy ritkán tapasztaltuk a hátsó szarvi és DRG neuronok SP-aktivációjára jellemző, elnyújtott depolarizációt.

Mindezeket egybevetve elmondható, hogy a SP a „klasszikus” nociceptív információfeldolgozásban betöltött szerepe mellett, nagy hatással van a gerincvelő egyéb neuronális hálózatainak működésére is, így valószínűleg a nociceptív információnak a gerincvelő egyéb funkcióiba való integrálásában is részt vehet. Ezt a feltételezést támasztja alá az az irodalmi adat, hogy a C-típusú primér afferensek ingerlésével, illetve SP adagolásával kiváltható flexor reflex érzékenység-fokozódás effektíven gátolható NK1 receptor antagonistával. Eddigi eredményeink jól beleilleszthetők a fent idézett megállapítások rendszerébe.

ÖSSZEFOGLALÓ

Az értekezésben bemutatott kísérletekben igazoltuk, hogy fiatal patkány lumbális DRG neuronjainak egy szub-populációja funkcionális NK1 receptorokat expresszál. Ez a megfigyelés jó egyezést mutat a DRG neuronok egy részének korábban már leírt SP érzékenységgel. Az NK1 receptor immunopozitív neuronok a kis-közepes mérettartományba tartoznak, amely sejtek korábbi adatok alapján A δ és C típusú rostokkal rendelkeznek. Igazolt tény, hogy ezen rostok zöme a gerincvelő I-es laminájában végződik. Immunhisztokémiai elárással megvizsgálva az NK1 receptor expresszió megoszlását fiatal patkányok lumbális gerincvelő szakaszain, a felszínes laminákban, főleg az I-es területén a fentiekkel összhangban intenzív rost- és sejtjelölődést kaptunk. Az NK1 receptor immunoreaktivitás megoszlása megfelelt a felnőtt állatban korábban leírt eloszlásnak.

A lumbális gerincvelő V-VI-os lamináiban és intermediér szürkeállományában NK1 receptor immunoreaktív sejttestekkel rendelkező, nagyméretű neuronokat találtunk, amelyeknek karakterizálását kombinált morfológiai-elektrofiziológiai módszerekkel végeztük el. Tüzelési mintázataik alapján az itt található neuronokat négy csoportba soroltuk, melyek közül hármat korábban a gerincvelő más területein már megfigyeltek. Kísérleteinkben leírtunk egy negyedik, ún. „slow” tüzelési mintázatot, amit ezidáig a gerincvelőben máshol nem említettek. A „slow” sejtek mind jellegzetes morfológiájuk, mind eloszlásuk alapján elkülönültek a terület többi sejtjétől.

Az intermediér szürkeállomány neuronjain található NK1 receptorok funkciójának vizsgálatakor nagymértékű EPSP szám növekedést figyeltünk meg SP alkalmazását követően. Az ily módon igazolt preszinaptikus hatás mellett azonban egyes sejtek esetében a membrán bizonyos paramétereinek (bemeneti ellenállás, tüzelési küszöb) megváltozását is megfigyeltük, ami a sejten funkcionális NK1 receptorok jelenétére utalhat.

Fenti eredmények hozzájárulhatnak a tachykininek fájdalominformáció-feldolgozásban és nociceptív reflexekben betöltött szerepének jobb megértéséhez.

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ FELHASZNÁLT SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

1. **P. Szucs**, E. Polgar, I. Spiegelman, R. Porszasz and I. Nagy: Neurokinin 1 receptor expression on young rat dorsal root ganglion neurons. *J. Periph. Nerv. Sys.*, **4**: 270-278, 1999. IF: **1,038**
2. E. Polgar, **P. Szucs**, L. Urban, K. Matesz and I. Nagy: Immunohistochemical localization of neurokinin-1 receptor in the lumbar spinal cord of young rats: morphology and distribution. *Somatosensory & Motor Research*, **16(4)**: 361-368, 1999. IF: **0,931**
3. **P. Szucs**, F. Odeh, K. Szokol and M. Antal: Neurons with distinctive firing patterns, morphology and distribution in laminae V-VII of the neonatal rat lumbar spinal cord. *Eur. J. Neurosci.*, **17**, 537-544, 2003. IF: **3,919**

Összesített IF: 5,888

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

1. A. Kulik, E. Polgar, C. Matesz, **P. Szucs**, S. Kothalawala and I. Nagy: Sub-population of capsaicin sensitive primary afferent neurons in thoracic, lumbar, and sacral dorsal root ganglion in young rats revealed by stimulated cobalt uptake. *Acta Biol. Hung.*, **47 (1-4)**: 385-394, 1996. IF: **0.291**
2. I. Nagy, J. Croxford, E. Polgar, **P. Szucs**, A. Dray and L. Urban: GAP-43 immunoreactivity is enhanced after UV irradiation in the peripheral nervous system of the rat. *Primary Sensory Neuron*, **2**: 43-63, 1997. IF: -
3. E. Polgar, **P. Szucs**, L. Urban and I. Nagy: Substance P immunoreactivity in rat spinal dorsal horn after ultra violet irradiation induced hind paw inflammation. *Brain Res.*, **786**: 248-251, 1998. IF: **2.526**
4. G. Maccaferri, J. D. B. Roberts, **P. Szucs**, C. A. Cottingham, P. Somogyi: Cell surface domain specific postsynaptic currents evoked by identified GABAergic neurones in rat hippocampus *in vitro*. *J. Physiol.*, **524**: 91-116, 2000. IF: **4.450**
5. P. Ganter, **P. Szűcs**, O. Paulsen and P. Somogyi: Properties of horizontal axo-axonic cells in stratum oriens of the hippocampal CA1 area of rats *in vitro*. *Hippocampus*, 2003 (in press) IF: **4.330**
6. I. V. Melnick, S. Santos, P. Szűcs and B. V. Safronov: Ionic basis of tonic firing in spinal substantia gelatinosa neurons of rat. *J Neurophysiol*, 2003 (submitted).

Összesített IF: 11,597

ELŐADÁSOK, ABSZTRAKTOK

1. **P. Szucs**, E. Polgar, I. Nagy: Activation of dorsal root ganglion cells with Substance P. Worldwide Hungarian Medical Academy, Pécs, Hungary, July 4-6, 1996.
2. **P. Szucs**, E. Polgar, I. Nagy: NK1 receptor expression in dorsal root ganglion cells of young rats. MAT'IX., Szeged, Hungary, April 4-6, 1997.
3. **P. Szucs**, E. Polgar, L. Urban, S. Jeftinija and I. Nagy: Spinal cord neurons in which interaction between N-methyl-D-aspartate and neurokinin-1 receptors may occur. *Soc. Neurosci.* 156.5 (1995).
4. I. Nagy, E. Polgar, **P. Szucs**, L. Urban and J.N. Wood: Plastic changes in neurokinin-1 receptor expression of spinal cord neurons in inflammatory hyperalgesia. *Soc. Neurosci.* 44.7 (1995).
5. I. Nagy, E. Polgar, **P. Szucs**, A. Matisz and L. Urban: Neurokinin 1 receptor expression by dorsal root ganglion neurons in young rats. *IASP Publications*, Congress Abstracts, 121 (1996).
6. **P. Szucs**, E. Polgar and I. Nagy: Spinal cord neurons in which interaction between N-methyl-D-aspartate and neurokinin-1 receptors may occur. *Neurobiology*, 4 (1996) 281-282.
7. **P. Szucs**, E. Polgar, I. Spiegelman, R. Porszasz, I. Nagy: Dorsal root ganglion cells expressing the NK1 receptor in young rats. *Neurobiology*, 5 (1997).
8. E. Polgar, **P. Szucs**, K. Matesz, L.A. Campbell, L. Urban and I. Nagy: Locally injected nerve growth factor increases substance P synthesis in dorsal root ganglion neurons in all segments. *European Neuropeptide Club, Abstracts*, P10 (1997)
9. P. Somogyi, P. Ganter, N. Kogo, G.M. Maccaferri, C. Paspalas, O. Paulsen, J.D. Roberts, R. Shigemoto, **P. Szucs**: Compartmentalisation and properties of synapses and receptors in a feedback circuit of the cerebral cortex. *J. Physiol.* (1999), **518P**, pp. 22S *Proceedings of the scientific meeting held at UCL, 20-22 April, 1999*
10. **P. Szucs**, F. Odeh, K. Szokol and M. Antal: Electrophysiological and morphological characteristics of neurons in the intermediate gray matter (laminae V-VII) of the neonatal rat lumbar spinal cord *in vitro*. IBRO CEER, Neurobiology (*in press*, 2002)
11. **P. Szucs**, F. Odeh, K. Szokol, M. Antal: Electrophysiological and morphological characteristics of neurones in the intermediate gray matter (laminae V-VII) of the neonatal rat lumbar spinal cord *in vitro*. FENS, July 2002, Paris.
12. **P. Szucs**, M. Antal, K. Szokol, F. Odeh, P. Poisbeau: Modulation of neuronal excitability by substance-P in laminae V-VII of the neonatal rat lumbar spinal cord. MITT, January 2003, Balatonfüred, HUNGARY