

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

---

**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**  
**korábban Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola**

---

**DEBRECEN, 2010.**

## A doktori értekezés impresszuma

# A HCN2 IONCSATORNÁK EXPRESSZIÓJA PATKÁNY GERINCVELŐ HÁTSÓ SZARVÁBAN ÉS SZEREPE A GYULLADÁSOS FÁJDALOM TRANSZMISSZIÓJÁBAN

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében az elméleti orvostudományágban

Írta: **Papp Ildikó** okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Idegtudományok Doktori Iskolája, korábban a Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola (Élettan és Neurobiológia programja) keretében

Témavezető: **Prof. Dr. Antal Miklós**, az MTA doktora

### A doktori szigorlati bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Csiba László, az MTA doktora

Tagok: Prof. Dr. Fülesdi Béla, az MTA doktora  
Dr. Hernádi László, Ph.D.

**A doktori szigorlat időpontja:** 2010. július 09. 11 óra, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

**Az értekezés bírálói:** Dr. Puskár Zita, Ph.D.  
Dr. Rusznák Zoltán, Ph.D.

### A bírálóbizottság:

Elnök: Prof. Dr. Csiba László, az MTA doktora

Opponensek: Dr. Puskár Zita, Ph.D.  
Dr. Rusznák Zoltán, Ph.D.

Tagok: Prof. Dr. Fülesdi Béla, az MTA doktora  
Dr. Hernádi László, Ph.D.

**Az értekezés védésének időpontja:** 2010. július 09. 13 óra, I. Belgyógyászati Klinika tanterme

## 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, membránde polarizáció 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.

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.

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

## CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásaink kezdetén nem voltak irodalmi adatok arra vonatkozóan, hogy a HCN ioncsatorna fehérjék kifejeződnek-e a primer afferensek gerincvelői centrális terminálisaiban, így azt sem tudtuk, hogy az  $I_h$  ionáramok szerepet játszhatnak-e a primer afferens gerincvelői szekunder érző neuron közötti szinaptikus transzmisszió szabályozásában. Nem vizsgálták még azt sem, hogyan változik a HCN ioncsatornák kifejeződése az elsődleges érző neuronokban krónikus gyulladási fájdalom esetén. Kutatásaink ebből a szempontból úttörő jellegűnek bizonyultak.

Vizsgálataink során a következő kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

1. Kifejeződnek-e a patkányok gerincvelői dúcsejtjeiben expresszálandó HCN ioncsatorna izoformák a gerincvelő hátsó szarvában végződő elsődleges érző neuronok centrális axonterminálisaiban?
2. Milyen típusú primer afferensek expresszálják a HCN2 ioncsatorna fehérjéket és ezek milyen neurokémiai jellemzőkkel és poszt-szinaptikus kapcsolatokkal rendelkeznek a rágszálak gerincvelőjének felületes hátsó szarvában?
3. Milyen szerepet játszhatnak a nociceptív primer afferensek axonterminálisaiban expresszálandó HCN2 ioncsatornák a nociceptív ingerületátvitelben?
4. Változik-e a HCN2 fehérjék kifejeződése a gerincvelő felületes hátsó szarvában Freund-adjuváns által kiváltott krónikus gyulladási fájdalomállapotban?

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### *Kísérleti állatok és a szövetmetszetek előkészítése*

Kísérleteinkhez 42 felnőtt és 9 háromhetes, hím Wistar-Kyoto patkányt, valamint 3 GAD65-eGFP-s transzgenikus egeret használtunk. Az immunhisztokémiai vizsgálatokra szánt 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 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 szacharóz oldatba helyeztük, amíg le nem süllyedtek. 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 0,1 M-os foszfát pufferben 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.

A teljes Freund-adjuvánssal (CFA) kiváltott gyulladásos fájdalommodellben felhasznált 9 felnőtt, hím patkányt hármasával 3 csoportba osztottuk. Az egyik csoportnak fiziológiás sóoldattal 1:1 arányban hígított teljes Freund-adjuvánst (CFA, 100 µl) a másik csoportnak fiziológiás sóoldatot (100 µl) 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, majd a negyedik napon az állatokat a fent leírtak szerint perfundáltuk. A kivett L3-L5 gerincvelői szegmentumokból 60 µm-es úszó sorozatmetszeteket készítettünk, amelyeket a fentiekhez hasonlóan készítettünk elő az inkubálásra.

### *Magatartás-vizsgálat a mechanikai allodynia kimutatására*

Az egyik leggyakrabban alkalmazott gyulladásoos fájdalommodell, a Freund-adjuváns által kiváltott gyulladásoos fájdalommodellt választottuk a HCN2 ioncsatorna expressziójának gyulladásoos fájdalomállapotban való vizsgálatára. Gyulladásoos 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). A patkányok hátsó talpát a rácsozott aljzatú mérőrekeszben alulról, egy fém filamentum 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 talpvisszahúzási küszöbértékét regisztráltuk, a gyullasztás előtt és azt követően.

### *Immunperoxidáz hisztokémiai vizsgálatok*

A HCN2 ioncsatorna és a c-Fos fehérjék gerincvelői expressziójának kimutatására indirekt, DAB alapú immunperoxidáz módszert használtunk. A kezeletlen és kezelt (operált vagy Freund-adjuvánnal injektált) állatok lumbális gerincvelőiből származó úszó metszeteket először 20%-os normál kecske sérumban (NGS) 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. A metszeteket először nyúlban termelt anti-HCN2 (1:400), illetve anti-c-Fos primer antitesttel (1:8000) inkubáltuk 2 napig 4 °C-on, majd alapos mosást követően a metszeteket biotinilált, kecskében termelt nyúl elleni (b-GAR) IgG-vel (1:200) kezeltük 5-6 óráig szobahőmérsékleten. Többszöri mosás (1% NGS TPBS-ben) után avidin-biotinilált tormaperoxidáz komplex-szel (ABC, 1:100) inkubáltuk a metszeteket egy éjszakán keresztül 4 °C-on, és végül az immunreakciót diaminobenzidin (DAB) kromogén reakcióval tettük láthatóvá. A metszeteket zselatinózott tárgylemezre szedtük fel, majd felszálló alkoholsorban víztelenítettük, és Permout fedőanyaggal lefedtük.

Az általunk használt primer antitest (anti-HCN2, Alomone Labs.) specititását HCN2 peptiddel történő kimerítéssel teszteltük. 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 metszeteken a primer antitestet normál nyúl szérummal (NRS, 1:100) helyettesítettük. Ezeken a metszeteken nem tudunk megfigyelni specifikus immunperoxidáz reakciót.

A HCN2 immunfestődésről Spot kamerával felszerelt Nikon Eclipse 800 mikroszkóppal fénymikroszkópos felvételeket készítettünk. A HCN2 immunreaktivitás kvantitatív vizsgálatát Image J program segítségével végeztük, melynek során megmértük az immunreaktív területek nagyságát a felületes hátsó szarv mediális, intermedier és laterális régióiban, illetve teljes mediolaterális kiterjedésében.

A c-Fos immunreaktivitás kvantitatív vizsgálatához először camera lucidával kirajzoltuk az L4-es gerincvelői metszetek felületes hátsó szarvának c-Fos-pozitív sejtjeit, majd Neurolucidával háromdimenziósan rekonstruáltuk az immunreaktív sejtek megoszlását. A mennyiségi elemzés során a hátsó szarv fentebb említett régióiban, illetve teljes mediolaterális kiterjedésében megszámláltuk a c-Fos-immunreaktív sejteket. A kvantitatív analíziseket mind a HCN2, mind a c-Fos immunreaktivitás esetében 3-3 CFA injekciót kapott és kontroll patkány metszetein (10 metszet/állat) mindkét oldali hátsó szarv I-II-es laminájában elvégeztük.

#### *Preembedding nanogold immunhisztokémiai vizsgálatok*

A HCN2-immunreaktív axonvégzódések ultrastrukturájának és a HCN2 fehérje szubcelluláris eloszlásának tanulmányozására elektronmikroszkópos vizsgálatokat végeztünk. 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 foszfát pufferrel (PB) átmostuk, majd 1%-os nátrium-borohidrid (NaBH<sub>4</sub>) oldattal kezeltük 30 percig. Ezután a metszeteket nyúlban termelt anti-HCN2-vel (1:400) inkubáltuk 2 napig 4 °C-on, majd 1 nm-es aranyzemcséhez kötött, kecskében termelt anti-nyúl IgG-t (GAR-Au, 1:100) kapcsoltunk a primer antitesthez (6 óra szobahőn). 2,5%-os glutáraldehiddel történő utófixálást követően a metszeteket többször átmostuk, majd a szekunder antitesthez konjugált aranyzemcséket ezüst intenzifikáló reagenssel tettük láthatóvá. Ezt követően a metszeteket 1%-os ozmium-tetroxiddal (OsO<sub>4</sub>) 45 percig kezeltük, majd felszálló alkoholsorban és propilén-oxidban víztelenítettük, Durcupan ACM műgyantába ágyasztuk, végül 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, nikkal „slot” grid-ekre szedtünk fel és uranil-acetáttal, illetve ólom-nitráttal kontrasztoltunk meg.

### *Immunfluoreszcens hisztokémiai vizsgálatok*

A HCN2-immunreaktív nociceptív primer afferens terminálisok preszinaptikus markereinek és posztszinaptikus targetjeinek kimutatására, a lumbális gerincvelőből és a gerincvelői dúcokból származó metszeteken fluoreszcens, kettős és hármas jelöléses immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk. A különböző eredetű axonok azonosításához és a posztszinaptikus célsejtek vizsgálatához 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)

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

(4) 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), vagy normál ló szérummal (NHS) 50 percig blokkoltuk, majd mosást követően primer antitestek keverékével inkubáltuk 2 napig 4 °C-on. A kettős és hármas jelöléses immunfluoreszcens vizsgálatoknál a nyúlban termelt anti-HCN2 (1:200) mellett a fenti markerek ellen termelt primer antitesteket használtuk. Ezután fluoreszcens festékekkel konjugált szekunder antiszérumok megfelelő keverékével inkubáltuk a metszeteket 5-6 óráig szobahőmérsékleten. Többszöri mosást követően a metszeteket tárgylemezre szedtük fel és Vectashield fedőanyaggal fedtük le.

Annak érdekében, hogy kizárjuk a HCN2 és SP antitestek keresztreakcióját, ami a két marker immunreaktivitásának nagymértékű kolokalizációja miatt vetődött fel, néhány metszeten HCN2-peptidet és P-anyagot alkalmazva kimerítéssel és keresztimerítéssel teszteltük az antitestek specifitását.

Az immunfluoreszcens metszeteket Olympus Fluoview FV1000 konfokális lézer scanning mikroszkóppal digitalizáltuk. A HCN2 immunreaktivitás preszinaptikus

markerekkel való kolokalizációjának kvantitatív vizsgálatához a konfokális szoftver Neurolucida programját használtuk. Az elemzést három állatból származó, 1  $\mu\text{m}$  vastag konfokális optikai felvételeken végeztük (3 felvétel/állat), amelyeken véletlenszerűen kiválasztottunk 100, az egyik markerre immunfestett axonterminálist a hátsó szarv I-IIo laminájában, és megvizsgáltuk, hogy immunreaktív-e a másik markerre. A gyulladásos fájdalommodellben a HCN2 és SP kolokalizációs vizsgálatát úgy végeztük, hogy a konfokális optikai felvételekre standard négyzetrácsot helyeztünk és megszámloltuk a rács oldalaira eső egyszeresen, vagy kétszeresen festődő axonterminálisokat. A számolást 3-3 kontroll és CFA injekciót kapott állat 10 konfokális felvételén végeztük el.

### *Elektrofiziológiai vizsgálatok*

A HCN2 ioncsatornák a nociceptív primer afferens terminálisok és a gerincvelői érző neuronok közötti szinaptikus jelátvitelben való szerepének vizsgálatára, háromhetes patkányokon elektrofiziológiai vizsgálatokat végeztünk. Izofluránnal történő mély altatás során dekapitáltuk az állatokat, majd eltávolítottuk a lumbális gerincvelőt és oxigenizált, mesterséges cerebrospinalis folyadékba (pH 7,4) helyeztük. A hátsó gyökereket is magában foglaló, 7-9 mm hosszú gerincvelői blokkokat agarba ágyasztuk és 400-600  $\mu\text{m}$ -es szeleteket készítettünk belőlük Vibratommal. A túlélő gerincvelő szeletpreparátumokon való méréseket mesterséges cerebrospinalis folyadékkal átáramoltatott mérőkádban végeztük.

A gerincvelő I-II-es lamináiban elhelyezkedő neuronokat, 40x-es vízimmerziós lencsével, interferencia kontrasztszűrővel és infravörös kamerarendszerrel felszerelt Zeiss Axioskop FS mikroszkóppal azonosítottuk. A gerincvelő hátsó gyökerére stimuláló elektródot helyeztünk és az ingerlés hatására az I-II-es lamina egyedi neuronjain kiváltott posztzinaptikus válaszokat teljes sejt patch-clamp regisztrálással, current-clamp módban mértük. A mérésekhez 4-6 M $\Omega$  ellenállású patch-pipettát és Axoclamp ID erősítőt használtunk. A hátsó gyökereket 0,2 Hz-en, 0,5-2,0 mA erősségű 0,1 ms-ig tartó áramimpulzusokkal stimuláltuk, miközben regisztráltuk azon hátsó szarvi neuronok spontán és stimulációval kiváltott serkentő posztzinaptikus potenciáljait (EPSP), valamint akciós potenciáljait, amelyek monoszínaptikus bemeneteket kaptak a C és/vagy A $\delta$  primer afferensektől. 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 posztzinaptikus neuronon. Először kontroll körülmények között regisztráltuk az EPSP-eket, majd a HCN-csatorna blokkolójának (ZD7288, 10  $\mu\text{M}$ ) alkalmazása mellett mértük

az I-II-es lamina sejtjeinek posztszinaptikus válaszait. Végül folyamatos regisztrálás mellett kimostuk a ZD7288-at a fürdőfolyadékból.

Az adatokat digitalizáltuk (Digidata 1320) és számítógépen rögzítettük. A mérések adatait Pclamp, Origin és Whole Cell Program and Electrophysiology Data Recorder szoftverek segítségével elemeztük.

#### *Western blot analízis*

Az elemzéshez 15 felnőtt, hím patkányt használtunk, amelyek közül kilencnél, hígított teljes Freund-adjuvánssal (CFA) unilaterális talpgyulladásztást végeztünk. Az injektálást megelőzően és követően is megmértük az állatok nociceptív válaszkészségét és a gyulladás utáni negyedik napon diethyl-éteres túlaltatást követően kivettük az állatok gerincvelőjének lumbális L4-es szegmentumát. A kísérletekhez hat intakt patkányt használtunk kontrollként.

A lumbális gerincvelők hátsó szarvai kerültek feldolgozásra oly módon, hogy a minták egy részénél membránpreparálást követően csak membránfrakciót, a másik részénél pedig teljes szövettelizátumot 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 2% Triton-X 100-at tartalmazó lízis pufferben (20 mM TRIS, 137 mM NaCl, pH 7,4) feloldottuk, majd 50 000 g-n 4 °C-on 55 percig centrifugáltuk. 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. 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 fehérjéket elektroforetikusan vittük át PVDF membránra, amelyeket 10% normál borjú szérumot (NBS) tartalmazó TTBS oldattal blokkoltunk, majd nyúlban termelt anti-HCN2-vel (1:1000) és loading kontroll antitesttel (egérben termelt anti-β-tubulin, 1:4000) inkubáltunk szobahőmérsékleten 2 óráig. Többszöri TTBS mosást követően, az antitestekhez biotinilált anti-nyúl IgG-t, illetve biotinilált anti-egér IgG-t (1:200), majd ABC-komplexet (1:100) kapcsoltunk. Az immunjelölt fehérje sávokat DAB kromogén reakcióval tettük láthatóvá. Az immunoblotokat Gelcapture programmal fényképeztük le. Az immunoblotok eredményein Gelquant programmal denzitometriás elemzést végeztünk, majd a kapott adatokat a belső, loading kontroll (β-tubulin) értékeihez normalizáltuk.

### *Statisztikai analízis*

A kvantitatív elemzések során kiszámoltuk az adatok átlagértékeit és standard középhibáját (SEM), és a megfigyelt különbségeket egyváltozós ANOVA módszerrel, illetve az elektrofiziológiai vizsgálatoknál kétmintás t-próbával értékeltük ki statisztikailag. A különböző mértékű szignifikancia-szinteket egy, kettő, illetve három csillaggal jelöltük (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## EREDMÉNYEK

### *HCN2 immunreaktivitás a gerincvelő hátsó szarvában*

Az immunperoxidáz hisztokémiai vizsgálatok alapján azt találtuk, hogy a HCN2 immunreaktivitás a patkány gerincvelő felületes hátsó szarvának I-IIo lamináiban erőteljes pontszerű festődést mutatott. Több esetben az immunjelölt pontok hosszanti sorokba rendeződve a fehér- és szürkeállomány határával párhuzamosan helyezkedtek el az I-es laminában, vagy betérjedtek a hátsó szarv mélyebb lamináiba. A hátsó szarv felületes lamináiban megfigyelhető erős immunfestődéssel szemben, a mélyebb laminák nem mutattak immunjelölést. A HCN2 immunreaktivitás pontszerű, axonterminális jellegű jelölést mutatott, és egyáltalán nem adott szomatikus, vagy dendritikus immunfestődést a lumbális gerincvelő hátsó szarvában. 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.

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

Annak kimutatására, hogy a HCN2 fehérjét peptiderg, vagy nem-peptiderg típusú primer afferensek szállítják centrális axonterminálisaikba, hármas jelöléses immunfluoreszcens módszerrel vizsgáltuk a HCN2 kolokalizációját CGRP immunreaktivitással és IB4 kötődéssel. A CGRP-t a peptiderg nociceptív primer afferensek (Lawson, 1995), míg az IB4 kötődést a nem-peptiderg nociceptív primer afferensek markereként tartják számon (Gerke és Plenderleith, 2002).

Az irodalmi adatoknak megfelelően kimutattuk, hogy a CGRP-immunreaktív axonterminálisok a gerincvelő hátsó szarvának I-IIo lamináiban adtak immunfestődést, míg az IB4 kötődést mutató terminálisok szinte kizárólag a II-es lamina belső részében (IIi) jelentek meg. Ennek megfelelően a HCN2 a CGRP immunreaktivitással mutatott jelentős kolokalizációt a hátsó szarv I-IIo lamináiban, míg az IB4 kötődéstől szinte teljesen szegregálódott.

Érdekes módon, a gerincvelői dúcsejtek szinte mindegyike immunreaktív volt HCN2-re, így mind a CGRP-immunreaktívok, mind az IB4 kötődést mutatóak pozitívan festődtek HCN2-re is.

### *HCN2 fehérjék szubcelluláris megoszlása a peptiderg nociceptív primer afferensek axonterminálisaiban*

A HCN2-re immunfestett neuronális elemek ultrastrukturáját preembedding nanogold immunhisztokémiai módszer segítségével vizsgáltuk a gerincvelő felületes hátsó szarvában. A HCN2 molekulákat jelölő ezüst szemcséket kizárólag 0,5-2,5  $\mu\text{m}$  átmérőjű axonvégződésekből találtuk, glia nyúlványok és idegsejtek dendritjei vagy sejttestjei nem mutattak HCN2 immunjelölést. Az immunreaktív axonterminálisok glomeruláris és nem-glomeruláris típusú szinaptikus elrendeződésben egyaránt megtalálhatóak voltak, és a glomeruláris szinapszisoknál mindig a központi axonvégzések mutattak immunreakciót. Az immunreaktív axonterminálisok szinte mindegyikében, a szinaptikus vezikulák között elsősorban dense core vezikulákat is találtunk, amelyek a peptiderg axonvégzésekre jellemzőek.

A HCN2 fehérjéket jelző szemcsék szubcelluláris megoszlását vizsgálva, az axoplazmában található szemcsék mellett a terminálisok sejtmembránjához tapadva is gyakran találtunk jelölődést. A membránhoz asszociált ezüst szemcsék a membrán intracelluláris oldalán jelentek meg, és mindig extraszinaptikus lokalizációt mutattak, bár közülük néhány a szinaptikus appozíció közvetlen szomszédságában helyezkedett el.

### *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 axonvégzések glutamát tartalmának kimutatásához a glutamáterg terminálisok legjellemzőbb markereinek, a vezikuláris glutamát transzportereknek (VGluT1-3) az immunreaktivitását vizsgáltuk a gerincvelő felületes hátsó szarvában. A peptiderg nociceptív primer afferensek egy része glutamát mellett P-anyagot (SP) is felszabadít neurotranszmitterként, 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 a VGluT2 mutatta a legerősebb immunfestődést, a VGluT3 immunreaktivitás sokkal gyengébb jelölődést adott, míg a VGluT1 immunjelölés csak elsősorban volt megfigyelhető és inkább a mélyebb laminákra korlátozódott. A VGluT immunfestődés szinte teljesen elkülönült a HCN2 immunreaktivitástól, és a vizsgált HCN2-immunreaktív terminálisok csupán 6%-a mutatott kolokalizációt a felületes hátsó szarvban

nagyobb mennyiségben jelenlevő VGluT2-vel. Összhangban az irodalmi adatokkal, a P-anyag immunreaktivitása – a HCN2 immunfestődéshez hasonlóan – a gerincvelői szürkeállomány I-IIo laminájában adott intenzív immunjelölést. Ezenkívül a HCN2 és az SP igen nagymértékű kolokalizációt (92%) mutatott a gerincvelő felületes hátsó szarvában.

*A HCN2-immunreaktív primer afferensek posztszinaptikus kapcsolatai serkentő és gátló gerincvelői interneuronokkal*

Irodalmi adatok alapján a peptiderg nociceptív primer afferensek serkentő és gátló interneuronokkal is kapcsolatba lépnek a gerincvelő felületes hátsó szarvában (Hayes és Carlton, 1992; Wang és mtsai, 2000). A HCN2-pozitív peptiderg nociceptív primer afferensek posztszinaptikus célsejtjeinek azonosítására kettős és hármas jelöléses immunfluoreszcens módszert használtunk, az alábbi markerek bevonásával: NK1-R, calbindin D28k, MOR, AMPA-típusú glutamát-receptor GluR2-es alegysége, és GAD65-eGFP. A korábbi megfigyeléseket megerősítve azt találtuk, hogy az NK1-R-immunreaktív neuronok sejttestjei a hátsó szarv I. és III-IV. lamináiban fordultak elő. Az I-es laminában lévő NK1-R-immunreaktív neuronok dendritjei a laminán belül elágazódtak, a mélyebb laminákban elhelyezkedők dendritjei viszont felnyúltak a hátsó szarv felületes lamináiba és ott arborizáltak. A HCN2-pozitív axonterminálisok egyrészt az I-es lamina NK1-R-pozitív sejttestjeivel és dendritjeivel hoztak létre szoros kapcsolatokat, másrészt az immunreaktív axonkollaterálisok sorozatos appozíciókat alakítottak ki a mélyebb laminák felől érkező NK1-R-pozitív dendritekkel. 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. Alátámasztva a korábbi eredményeket, a 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. A HCN2-immunreaktív terminálisok a CaB- és MOR-pozitív neuronok szómájával és dendritjeivel, illetve a GluR2-immunreaktív idegsejtek szómájával alakítottak ki szoros appozíciókat.

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 axonvégződésekkkel, amelyek elsősorban a GFP-pozitív neuronok sejttestjével és primer dendritjével kerültek közeli kontaktusba.

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

A HCN ioncsatornák leggyakrabban használt szelektív antagonistája a ZD7288 elnevezésű anyag, ami 10  $\mu$ M-os koncentrációban teljesen blokkolja az I<sub>h</sub>-t (Harris és Constanti, 1995; Pal és mtsai, 2003). Azzal a céllal, hogy tanulmányozzuk a nociceptív primer afferensek axonterminálisaiban expresszálandó 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, amelyből 8 kapott monoszynaptikus bemenetet a C és/vagy A $\delta$  primer afferensektől. A stimulált primer afferenseket vezetési sebességük alapján azonosítottuk (C-rost: 0,3–0,8 m/s, A $\delta$ : 3,8–8 m/s). A vizsgált nyolc idegsejtből hat C rostoktól, egy A $\delta$  rostoktól kapott monoszynaptikus 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 számuk csak kismértékű csökkenést mutatott. Az antagonista kimosását követően jelentősebb késés nélkül visszaállt az sEPSP-k kontroll értékekre jellemző frekvenciája és amplitúdója.

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 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. A ZD7288 alkalmazásának kezdetén a jelátvitel hibaszázaléka csak kismértékben növekedett ( $46 \pm 15,5\%$ ,  $p = 0,21$ ), később viszont egyre magasabb értékeket ért el, és szignifikáns különbséget mutatott a kontroll értékekhez képest ( $74,7 \pm 14,5\%$ ,  $p = 0,0051$ ). A ZD7288 hatása reverzibilisnek bizonyult, ugyanis az antagonista kimosása során a jelátvitel hibaszázaléka visszatért a kontroll értékekhez ( $39,4 \pm 9,8\%$ ).

*A mechanikai allodynia kialakulása Freund-adjuváns által kiváltott gyulladással járó fájdalomállapotban*

A teljes Freund-adjuváns (CFA) subcutan injekciójával kiváltott gyulladás az egyik leggyakrabban alkalmazott gyulladással járó fájdalomállapot-modell (Iadarola és mtsai, 1988; Millan és mtsai, 1988). Kísérletünk során ebben a modellben vizsgáltuk a mechanikai allodynia kialakulását. A kontroll állatoknál és injektálás előtt a másik két állatcsoportnál is, a talpra alkalmazott 35–40 g nyomóerő váltott ki lábvisszahúzási reakciót, amit a mechanikai ingerlésre adott válaszkészség alapértékének tekintettünk. A CFA injekciót kapott állatoknál az ipszilaterális hátsó talp lábvisszahúzási küszöbértéke az injektálást követően fokozatosan csökkent, és az injektálást követő harmadik napra az alapérték 35%-ára esett vissza ( $12,4 \pm 0,9$  g,  $p = 0,004$ ). A fiziológiás sóoldattal injektált állatok ipszilaterális talpának lábvisszahúzási küszöbértéke az injekciót követő első és második napon kismértékben csökkent, de az injekciót követő harmadik napra visszaállt az alapértékre. 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.

*c-Fos fehérje expresszió a patkány gerincvelő felületes hátsó szarvában CFA-val indukált gyulladással járó fájdalomállapotban*

Az „immediate early genes” (IEG) géncsaládhoz tartozó c-Fos gén egy 62 kDa tömegű magfehérjét (c-Fos fehérje) kódol, amelynek immunreaktivitását régóta használják a neuronális aktivitás indikátoraként (Hunt és mtsai, 1987; Sagar és mtsai, 1988). Gyulladással járó modellünkben a gerincvelő hátsó szarvában lévő neuronok aktivitását a c-Fos fehérje immunreaktivitásával teszteltük.

Bár az unilaterális gyulladás csak az ipszilaterális oldalon váltott ki mechanikai allodynát, a c-Fos immunreaktivitás a gerincvelő mindkét oldali hátsó szarvában jelentősen megemelkedett, a kontroll állatokban számolt alapaktivitáshoz képest. A c-Fos-immunreaktív neuronok eloszlásának kvantitatív elemzése során azt találtuk, hogy a c-Fos-pozitív sejtek száma a CFA injekcióval azonos oldali felületes hátsó szarv laterális, intermedier és mediális régiójában, illetve teljes mediolaterális kiterjedésében szignifikánsan emelkedett. 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 hátsó szarvban. 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 jóval magasabb értékeket mutattak a CFA injekcióval azonos oldali hátsó szarvban.

*A HCN2 fehérje kifejeződése a lumbális gerincvelő hátsó szarvában CFA-val kiváltott gyulladással járó fájdalommal*

Annak vizsgálatára, hogyan változik a HCN2 immunreaktivitás és a HCN2 fehérje mennyisége a gerincvelő L4-es szegmentumának felületes hátsó szarvában Freund-adjuvánsal kiváltott gyulladással járó fájdalomállapotban, a következő kvantitatív elemzéseket végeztük: 1) mértük a HCN2-immunreaktív terület nagyságát, 2) meghatároztuk a HCN2- és SP-immunreaktív axonterminálisok számát és a két marker közötti kolokalizációt, illetve 3) mértük a HCN2 fehérje mennyiségét. A mérési eredményeket összehasonlítottuk a kezeletlen állatokban mért hasonló adatokkal.

A gerincvelő felületes hátsó szarvának HCN2-immunfestett területét fénymikroszkópos felvételeken, előzetes háttérszűrést követően, Image J szoftver segítségével mértük a hátsó szarv teljes mediolaterális kiterjedésében és fentebb említett három régiójában. Összehasonlítva a HCN2-immunreaktív területek kiterjedését a kontroll és CFA injekciót kapott állatokból készült metszeteken, nem találtunk értékelhető különbséget az immunfestett területek nagyságát illetően, sem az egyes régiókban, sem a hátsó szarv teljes mediolaterális kiterjedésében.

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 hátsó szarvban. A HCN2-pozitív axonterminálisok száma valamelyest nőtt a CFA injekcióhoz képest ellenoldali felületes hátsó szarv intermedier és mediális régiójában is. 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. Ezzel ellentétben a CFA injekcióhoz képest ellenoldali felületes hátsó szarv egyik régiójában sem találtunk szignifikáns változást az SP-immunreaktív terminálisok számában.

A HCN2-re és SP-re egyaránt festődő terminálisok számának alakulását vizsgálva azt figyeltük meg, hogy a CFA injekciót kapott állatok ipsilaterális felületes hátsó szarvában a laterális régió kivételével, jelentősen emelkedett a mindkét markerre festődő terminálisok száma. A kettősen festődő axonterminálisok száma a kontralaterális hátsó szarvban is nőtt, bár

kisebb mértékben, mint az ipsilaterálisban. A HCN2 és SP közötti kolokalizáció mértéke szinte alig változott a CFA injekciót kapott állatok ipszi- (82–86%) és kontralaterális felületes hátsó szarvában (83–88%), a kontroll állatok felületes hátsó szarvában számolt értékekhez képest (81–84%).

A HCN2 fehérjék mennyiségi alakulását Western blot elemzéssel vizsgáltuk a 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. Úgy találtuk, hogy az ipsilaterális hátsó szarvban a HCN2 fehérje relatív mennyisége szignifikánsan emelkedett mind a teljes lizátumból, mind a membránfrakcióból készült mintákban, a kontroll állatokban mért értékekhez képest. A kontralaterális hátsó szarvban viszont a HCN2 fehérje relatív mennyisége csak kismértékű növekedést mutatott a kontroll állatok értékeihez viszonyítva.

## MEGBESZÉLÉS

*A HCN2 ioncsatornák 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; Grafe és mtsai, 1997), sőt Moosmang és mtsai. (2001) a HCN izoformák eloszlását is leírták a különböző méretű dúcsejtekben. Arra vonatkozóan viszont nem találtunk semmilyen adatot az irodalomban, hogy a HCN ioncsatorna fehérjék expresszálódnak-e az elsődleges érző neuronok gerincvelői hátsó szarvban végződő centrális axonterminálisaiban is. Vizsgálataink során így elsőként mutattuk ki, hogy a HCN ioncsatorna fehérjék közül a 2-es izoformát (HCN2) az elsődleges érző neuronok egy csoportja centrális axonvégződéseiben is kifejezi. Habár in situ hybridizációs 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-immunreaktív axonterminálisok gerincvelői megoszlása, illetve intenzív kolokalizációja CGRP-vel és szegregációja az IB4 kötődéstől 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. A HCN2 immunreaktivitásnak ez a korlátozott lamináris megoszlása a gerincvelő hátsó szarvában azt feltételezi, hogy a különféle gerincvelői dúcsejtek különböző mértékben transzportálják a HCN2 fehérjét a centrális axonterminálisaikba. Valószínű, hogy a HCN2 fehérje centrális transzportját a szelektív axontranszportnak nevezett jelenség magyarázza, amely lehetővé teszi, hogy bizonyos fehérjék a perikarionokból vagy csak a centrális, vagy csak a perifériás axonterminálisokba szállíthatódnak. Bár a jelenség molekuláris mechanizmusa még nem tisztázott, elképzelhető, hogy a HCN2 fehérjék centrális transzportját irányító molekuláris apparátussal csak a peptiderg C és A $\delta$  primer afferensek rendelkeznek.

*A HCN2 ioncsatornák és a VGluT-ok immunreaktivitásának szegregációja a gerincvelő hátsó szarvában*

A glutamát, mint az egyik legelterjedtebb neurotranszmitter, szenzoros ingerületátvitel során a nociceptív C és A $\delta$  primer afferensekből is felszabadul. Mivel a glutamát morfológiai kimutatását nagymértékben megnehezíti általános jelenléte az idegrendszer fehérjéiben, ezért

a glutamáterg neuronok azonosítására a vezikuláris glutamát transzportereket használják, amelyek a glutamátot a szinaptikus vezikulába pumpálják. Mostanáig háromféle VGluT-ot (VGluT1-3) mutattak ki, amelyek megoszlását számos agyterületen és a gerincvelőben is leírták (Herzog és mtsai, 2001; Takamori és mtsai, 2002; Todd és mtsai, 2003). Ezen irodalmi leletek megegyeznek a VGluT-ok gerincvelői expressziójára vonatkozó vizsgálataink eredményeivel, miszerint a VGluT2 mutatta a legerősebb immunfestődést a hátsó szarv I-II-es lamináiban. Éppen ezért meglepő volt, hogy a VGluT2 és HCN2 immunreaktivitás között csupán kismértékű kolokalizációt találtunk, és a másik két VGluT pedig teljes szegregációt mutatott a HCN2 immunreaktivástól. A kolokalizáció szinte teljes hiánya azt jelzi, hogy a három, ismert VGluT-on kívül, egy ezidáig még ismeretlen vezikuláris glutamát transzporter expresszálódhat a nociceptív afferensekben.

*A HCN2 ioncsatornák és a P-anyag (SP) immunreaktivitásának kolokalizációja a gerincvelő felületes hátsó szarvában*

A HCN2 intenzív kolokalizációja CGRP-vel és szegregációja az IB4 kötődéstől a gerincvelő felületes hátsó szarvában 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 felszabadíthatnak, többek között P-anyagot (SP), amely köztudottan döntő szerepet játszik a nociceptív ingerületek áttevődésében a primer afferensekről a másodlagos érző neuronokra (Willis és Coggeshall, 2004). A HCN2 és SP immunreaktivitás között kimutatott nagymértékű kolokalizáció alapján feltételezhető, hogy a HCN2 ioncsatornák által mediált  $I_h$  ionáramok a fájdalomátviteli útvonal első átkapcsolódásánál modulálhatják a nociceptív primer afferensekről a másodlagos érző neuronokra SP által közvetített szinaptikus ingerületáttevődést.

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

Irodalmi adatok alapján, a nociceptív primer afferensek serkentő és gátló interneuronokkal egyaránt kapcsolatba lépnek a gerincvelő felületes hátsó szarvában (Carlton és Hayes, 1990; Wang és mtsai, 2000). Patkány gerincvelő hátsó szarvában kimutatták, hogy a nem-glomeruláris elrendeződést mutató peptiderg nociceptív primer afferens terminálisok egyáltalán nem kerültek szinaptikus kapcsolatba GABA-immunreaktív dendritekkel, azonban a glomeruláris C1 típusúak 28%-a szinaptikus kapcsolatokat alakított ki GABAerg dendritekkel (Bernardi és mtsai, 1995). Mivel a HCN2-t expresszáló peptiderg nociceptív primer afferens terminálisok döntő többségét nem-glomeruláris elrendezésben találtuk, és

csak kis hányaduk tartozott a glomeruláris C1 típusba, így érthető, hogy csak viszonylag kevés kapcsolatot találtunk a HCN2-immunreaktív terminálisok és a GAD65-eGFP-pozitív gerincvelői neuronok között. Valószínű tehát, hogy a HCN2 fehérjét expresszáló, peptiderg nociceptív primer afferensek elsősorban serkentő interneuronokkal létesítenek szinaptikus kapcsolatokat, és csak alkalmanként kerülnek kontaktusba gátló gerincvelői neuronokkal a rágszálók gerincvelőjének hátsó szarvában.

Irodalmi adatok bizonyítják, 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 intenzív kolokalizációja alapján feltételezhető, hogy a HCN2-t expresszáló SP-tartalmú primer afferensek is szinaptikus kapcsolatokat alakíthatnak ki az NK1-R-t, és nem-szinaptikus kapcsolatokat a MOR-t kifejező neuronokkal. Az is kiderült, hogy az NK1-immunreaktív neuronok nagy része projekciós neuron, a MOR-pozitív idegsejtek pedig a serkentő interneuronok egyik alcsoportjának tekinthetők. 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 a serkentő interneuronokra a gerincvelő felületes hátsó szarvában.

*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 aktivitástól függő módon, hosszú távra fokozni tudja a benne lezajló szinaptikus ingerületáttevődés erejét és megbízhatóságát. Ezt a jelenséget 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 fontos szerepet játszhat a centrális szenzitizáció – a nociceptív, fájdalomfeldolgozó ideghálózatok ingerületi állapotának tartós fokozódása – kialakulásában (Ji és mtsai, 2003).

Leírták, hogy a HCN ioncsatornák aktivációja az ingerületátvitel szinaptikus facilitálását idézi elő a rákok neuromuszkuláris szinapszisában és a hippocampus preszinaptikus moharostjainak LTP-jére is hatással van (Beaumont és Zucker, 2000; Mellor és mtsai, 2002). Ezeket a korábbi megfigyeléseket elektrofiziológiai eredményeink is

alátámasztják. A HCN ioncsatornák szelektív antagonistájának (ZD7288) alkalmazása során, csökkent a gerincvelői szeletpreparátumok hátsó szarvi neuronjaiban mért monoszínaptikus EPSP-k száma, ami alapján azt feltételezzük, hogy az  $I_h$  növelheti a színaptikus jelátvitel megbízhatóságát a primer afferensekről a másodlagos érző neuronokra, és így szerepet játszhat a fájdalomátvitel preszínaptikus modulációjában a gerincvelő hátsó szarvában.

Felmerül a kérdés, hogy az  $I_h$  aktivációja hogyan fokozhatja a színaptikus ingerületátvitel megbízhatóságát és vezethet hosszú távú facilitáláshoz. Az egyik lehetséges magyarázat, hogy a HCN-csatornák aktiválódása a terminális depolarizálódása révén kiválthatja a feszültségfüggő  $Ca^{2+}$ -csatornák megnyílását. Az ismétlődő ingerlések során beáramlott  $Ca^{2+}$  a kalcium-kalmodulin-függő adenilát-cikláz aktiválásán keresztül növeli a cAMP-szintet, ami tovább fokozza az  $I_h$  ionáramot, ezzel egyre nagyobb depolarizációt kiváltva, illetve a  $Ca^{2+}$ -csatornák deaktivációját lassítva. Így az  $I_h$  ionáram elhúzódo aktivációja a megnövekedett  $Ca^{2+}$ -beáramlás miatt, elősegítheti a neurotranszmitterek fokozott felszabadulását.

*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 allodyniát váltott ki, a gerincvelő felületes hátsó szarvában bilaterális neurokémiai változások alakultak ki. Amellett, hogy a HCN2 és SP immunreaktivitás jelentősen megnövekedett az ipszilaterális hátsó szarvban, a HCN2- és SP-immunreaktív terminálisok száma emelkedést mutatott a kontralaterális hátsó szarvban is. Hasonló változást tapasztaltunk a c-Fos-immunreaktív sejtszám tekintetében 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, kísérletes eredmények bizonyítják, hogy a gerincvelő kétoldali hátsó szarvát kommisszurális propriospinalis axonok kötik össze egymással (Szentágothai, 1964; Petkó és mtsai., 2004). A bejövő nociceptív ingerületek által aktiválódó, ipszilaterálisan elhelyezkedő kommisszurális axonokkal rendelkező neuronok közvetítésével megváltozhat az ingerlés valódi helyéhez képest kontralaterális gerincvelői hátsó szarv nyugalmi aktivitása is. Másrészt, supraspinalis eredetű bilaterális leszálló pályák által közvetített ingerületek szintén hozzájárulhatnak a CFA-injekcióval ellentétes oldali hátsó szarvban lévő ideghálózatok aktiválódásához.

Mivel az unilaterális kísérleti beavatkozások során a gerincvelői hátsó szarvban bilaterális változások alakulnak ki, ezért az ipszi- és kontralaterális hátsó szarvból származó adatok összehasonlítása, kezeletlen állatokból nyert valódi kontroll értékek nélkül, a kísérleti eredmények hibás értékelését eredményezheti.

*Preszinaptikus HCN2 ioncsatornák a nociceptív primer afferensek centrális axonterminálisaiban gyulladós fájdalomban*

Számos kísérletes adat bizonyítja, hogy a HCN ioncsatornák által közvetített  $I_h$  ionáramok jelentős szerepet játszanak a sérült primer afferens neuronok spontán, ún. ektopikus aktivitásában, amely végső soron fájdalomérzet kialakulásához vezet (Chaplan és mtsai., 2003; Luo és mtsai., 2007). Korábbi eredmények alapján az is feltételezhető, hogy a HCN2 ioncsatorna-mechanizmusoknak szerepe lehet a fájdalomfeldolgozó ideghálózatok centrális szenzitizációjának kialakításában krónikus gyulladós fájdalomállapotokban. Cho és mtsai. (2009) kimutatták, hogy 3-4 nappal a dura mater gyulladását követően, emelkedik a HCN fehérjék mennyisége a ganglion trigeminale-ban és megduplázódik a dura matert beidegző neuronok között a HCN2-immunreaktív neuronok száma. Több közleményben azt is leírták, hogy a specifikus HCN ioncsatorna-blokkoló ZD7288 alkalmazása, a koncentráció függvényében mérsékli a patkányok talpának termális hiperszenzitivitását és mechanikai allodiniáját (Dunlop és mtsai., 2009; Jiang és mtsai., 2008). Saját eredményeinket összevetve ezekkel a korábbi adatokkal valószínűnek tűnik, hogy a HCN2 ioncsatorna-fehérjék túlermelődése a gerincvelő felületes hátsó szarvában legalább részben magyarázatul szolgálhat a ZD7288 alkalmazása során megfigyelt fájdalomcsillapító hatásnak.

Az SP által mediált szinaptikus jelátvitel és a preszinaptikus HCN2 ioncsatorna-mechanizmusok közti szoros összefüggést a Freund-adjuvánsal indukált gyulladós fájdalomállapotban kapott eredményeink is megerősítik. A CFA-injekcióval kiváltott talpgyulladás során a gerincvelői felületes hátsó szarv HCN2 immunreaktivitása párhuzamosan emelkedett az SP immunreaktivitással. Továbbá a HCN2 és SP immunreaktivitás közti kolokalizáció, akárcsak 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 expresszió, növekedett a HCN2 kifejeződés is. Ez a nagyon erős kapcsolat a HCN2 és SP expresszió között azt jelzi, hogy a HCN2 ioncsatorna-mechanizmusok nemcsak ép állapotban, hanem krónikus gyulladós fájdalomban is szerepet játszhatnak az SP által közvetített gerincvelői fájdalomfeldolgozásban.

## 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 posztzinaptikus 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 érző neuronok 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 csatorna fehérjére immunreaktivitást mutató peptiderg nociceptív primer afferens terminálisok száma. Ugyanakkor 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.

## 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.* (In Press) **IF.: 3.418**

**Független idézetek száma: 15**

**Összesített impakt faktor: 10.947**

*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.