

**Ph.D Értekezés**

---

**A periaqueduktális szürkeállomány kapcsolatai az agytörzsi  
különböző területeivel patkányban**

**Dr. Odeh U. R. Francis**

**Debreceni Egyetem  
Orvos és Egészségtudományi Centrum  
Anatómia, Szövet- és Fejlődéstani Intézet  
2002**

## Bevezetés

Régóta ismert tény, hogy a mesencephalon periaqueductális szürkeállománya (PAG) kulcsfontosságú szerepet játszik a központi idegrendszer fájdalom feldolgozó mechanizmusában. Több, független tanulmányban igazolták, hogy a ventrolaterális PAG (vl-PAG) elektromos ingerlése elnyomja a nociceptív reflexeket és mély analgéziához vezet. Ugyanezek a megfigyelések megmutatták, hogy a PAG-ban magas szintű anatómiai és fiziológiai szerveződés figyelhető meg. A PAG alapvető funkcióiért – mint a védekező magatartás, kardiovaszkuláris funkciók, antinocicepció – felelős neuronok az agytörzs tengelye mentén különböző hosszúságú oszlopokba rendeződnek. A ventrolaterális sejtek csoportja különböző fájdalomszabályozó mechanizmusokban játszik szerepet.

Feltételezik, hogy a PAG egy direkt diszinaptikus úton fejt ki fájdalomcsillapító hatását. Az elméletnek megfelelően a vl-PAG monoszínaptikus kapcsolatban áll a gerincvelőbe vetítő szerotoninerg és noradrenerg RVM sejtekkel, valamint a híd noradrenerg magjaival. A monoszínaptikusan aktivált leszálló raphe-spinalis és coeruleo-spinalis pályák a gerincvelő hátsó szarvában végződnek és noradrenalin (NE) valamint szerotonint (5HT) bocsátanak ki. A kibocsátott 5HT és NE erősen gátolja a hátsó szarvi antinociceptív neuronokat, így hatásosan regulálja a fájdalomra adott válaszokat.

Egyre több kísérleti adat utal arra, hogy újra át kell gondolni ezt a látványos modellt, amely a PAG által kiváltott analgéziát egyenes, diszinaptikus pályaként mutatja be. Leírták, hogy a PAG nocicepcióért felelős területeinek egyes vagy sorozatimpulzusokkal való ingerlése után monoszínaptikusan nem aktiválódtak 5HT tartalmú sejtek. Ezen kívül számos kísérlet utal arra, hogy egy nem szerotoninerg mechanizmusnak is szerepe lehet a gerincvelő hátsó szarvának RVM kontrolljában. Az említett kísérletek azt is sugallják, hogy nem szükséges az RVM szerotoninerg sejtjeinek az aktiválódása az ingerelt PAG antinociceptív hatásának kiváltásához.

Jelenleg a híd noradrenerg magjainak az antinocicepcióban játszott szerepe is bizonytalan. Jelentős mennyiségű egymásnak ellentmondó adat áll rendelkezésre a híd noradrenerg magjainak az endogén fájdalomcsillapító körökben játszott szerepéről. Bizonyos kísérletek komoly direkt projekcióról számolnak be, míg mások nem találtak szignifikáns monoszínaptikus kapcsolatot a PAG és e magok közt. A helyzet hasonló az

RVM szerotoninerg sejtjeihez, és ugyanúgy kérdéses, hogy a hídnoradrenerg magjai alapvető fontossággal bírnának a vl-PAG és gerincvelő közti jelátvitelben.

Ha azt mondjuk, hogy nincs szükség a gerincvelőbe vetítő szerotoninerg vagy noradrenerg sejtek PAG-ból érkező monoszínaptikus aktiválására, akkor fel kell tennünk egy kérdést: „Milyen mechanizmusokkal képes mégis aktiválni a PAG a gerincvelő felé vetítő noradrenerg és szerotoninerg idegsejteket?”

### **Célkitűzések**

Anatómiai és fiziológiai módszerekkel vizsgáltuk a vl-PAG kapcsolatait az RVM-val és a hídnoradrenerg magokkal:

- A pálya jelölők és háromdimenziós számítógépes rekonstrukció segítségével tanulmányoztuk a ventrolaterális PAG vetületeinek eloszlását az agytörzsben.
- Immuncitokémiai technikákkal vizsgáltuk az idegsejtek immunreaktivitását (5HT, TH, GABA, Glycine és PPE ellenes antitestek felhasználásával) a hídban, nyúltvelőben és a rostrális ventromediális medulla azon területein, melyek bemeneteket fogadnak a vl-PAG-ból.
- In vivo elektrofiziológiával tanulmányoztuk az RVM idegsejtjeinek válaszait a nervus ischiadicus és a vl-PAG elektromos ingerlését követően.

### **Anyagok és módszerek**

#### **Morfológiai vizsgálatok**

##### ***Állatok, jelölő injekció, metszetkészítés***

A kísérleteket Wistar–Kyoto patkányokon mély nátrium-pentobarbitál (35 mg/kg) anesztéziában végeztük. Iontoforetikusan injektált Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L; 2.5%) használtunk anterográd jelölőanyagként. Az injekciót a PAG ventrolaterális részébe a következő koordinátákon végeztük: 0.6-0.8 mm a középvonaltól, 1.3-3.2 mm az interaurális vonaltól és 4.6-5.1 mm a felszíntől. Minden állat két injekciót kapott oly

módon, hogy a két szűrőhely egymástól 0.5-1.0 mm-re volt található rostrocaudális irányban.

Három hetes túlélést követően az állatokat újra elaltattuk, transzkardiálisan Tyrode oldattal perfundáltuk, majd az alábbi fixáló oldatok egyikével folytattuk a perfúziót: (i) 4% paraformaldehid és 0.2% pikrinsav 0.1M foszfátpufferben; (ii) 2.5% glutáraldehid, 0.5% paraformaldehid és 0.2% pikrinsav 0.1M foszfátpufferben; (iii) 4% paraformaldehid 0.1M foszfátpufferben. Az eltávolított agytörzset további két óráig utófixáltuk a perfúzióhoz is használt fixálóban, majd 60 mikrométeres szeleteket készítettünk vibratómmal.

### ***Pre-embedding Immuncitokémia***

A PHA-L immuncitokémiai kimutatására az úszó metszeteket biotinizált kecskében termelt PHA-L ellenes antitesttel (hígítás 1:1000) inkubáltuk. A következő lépésben avidin-biotin-peroxidáz komplexel (ABC; 1:100) reagáltattuk a metszeteket. Végül nikkell intenzifikált diamino-benzidin (DAB) kromogén reakciót végeztünk.

Annak tisztázására, hogy a PAG-ből érkező axonterminálisok létesítenek-e közeli kapcsolatot 5HT vagy NE tartalmú neuronokkal kettős jelölést végeztünk, melyben az axonális nyomkövetést kombináltuk az 5HT illetve thyrozin hirdoxiláz (TH) immuncitokémiai kimutatásával. A metszketek először kecskében termelt, biotinizált anti PHA-L antitest és nyúlban termelt anti 5HT (1:2000) vagy anti TH (1:1000) ellenes antitestek elegyében inkubáltuk. A következő lépésben ABC és goat anti-rabbit (1:200) IgG keverékébe kerültek a metszketek. A PHA-L jelölt axonokat és terminálisaikat nikkellel intenzifikált DAB kromogén reakcióval vizualizáltuk. A továbbiakban nyúl peroxidáz anti-peroxidáz komplexel (1:100) kezeltük a metszketeket, majd az 5HT illetve TH immunjelölődését DAB reakcióval tettük láthatóvá. A metszketeket zselatinos tárgylemezre szedtük, majd Premount-val fedtük.

### ***Post-embedding Immuncitokémia***

Külön szeleteket kezelünk 1%-os OsO<sub>4</sub> oldatban, majd dehidráltuk és tárgylemezeken Durcupan ACM resinbe ágyasztuk. A középső pontobulbáris hálózatos állomány (iRF) PHA-L végződéseiben gazdag területeit kivágtuk és újraágyasztuk,

ultravékony sorozatmetszeteket készítettünk, melyeket Formvar borítású nikkal gridekre szedtünk.

Az egymást követő grideken található metszeteken GABA és glicin immunhisztokémiát végeztünk. Anti-GABA (1:1000; Dr. J. Storm-Mathisen) vagy anti-glicin (2:1000; Dr. J. Storm-Mathisen) szérummal való inkubálást követően kecskében termelt anti-nyúl IgG-hez konjugált 20 nm-es kolloidarany (1:200) részecskékkel reagáltattuk a metszeteket, majd uranil-acetát és ólom-nitrát oldatokkal kontrasztoltuk őket.

### ***Immunfluoreszcens Lézer-letapogatószos Konfokális Mikroszkópia***

A szabadon úszó metszeteket az alábbi antitestek keverékével inkubáltuk: (i) kecske anti-PHA-L (1:500); egér anti-glutamát dekarboxiláz (GAD; 1:1000); nyúl anti-preproenkefalin (PPE; 1:500; Dr. T. Kaneko). A következő inkubáló oldat streptavidin-AlexaFluor 546 (1:2000), kecske anti-nyúl IgG-AlexaFluor 633 (1:500) és kecske anti-egér IgG-AlexaFluor 488 (1:500) összetevőkből állt. A metszeteket tárgylemezre szedtük, glicerol tartalmú 'anti-fade' médiummal fedtük. A preparátumokat lézer-letapogatószos konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

### ***Az anterográd jelölt axon terminálisok és az immunjelölt idegsejtek háromdimenziós rekonstrukciója***

A PHA-L jelölt axon terminálisok, az 5HT-immunoreaktív (SIR) és TH-immunoreaktív (THIR) eloszlását az agytörzsben sorozatmetszeteken vizsgáltuk. A metszetelek sorrendjére gondosan ügyelve minden negyedik metszeten PHA-L és 5HT, az első metszetekeken pedig PHA-L TH kettősjelölést végeztünk. A metszetekeket NEUROLUCIDA 3D számítógépes rekonstrukciós rendszerrel dolgoztuk fel. A számítógébbe tápláltuk a metszetelek kontúrjait, az anterográd jelölt axon terminálisok valamint a SIR és THIR neuronok pozícióját. A program megszámlolta az axonvégződéseket, a SIR és THIR idegsejteket, valamint kielemezte a jelölt sejtek és terminálisok közeli appozíciót.

## **Fiziológiai Kísérletek**

### ***Állatok és Sebészeti Technika***

A kísérleteket altatott, mesterségesen lélegeztetett, sztereotaxiás készülékben rögzített Spargi-Dawley patkányokon végeztük. Kipreparáltuk a bal nervus ischadicust és bipoláris hurokelektrodákat helyeztünk rá az elektromos ingerléshez. Interparietális és occipitális kraniotómiával nyitottuk meg a koponyát, a kisagyat szívással távolítottuk el a mikroelektrodák pontosabb célbajuttatásához a jobb vl-PAG-ba és RVM-ba.

### ***Intracelluláris RVM Idegsejt Elvezetés***

Az RVM-ből az alábbi koordinátákon található sejtekről vezettünk el intracellulárisan: 0.1-1.2 mm a középvonaltól, 3.0-4.0 mm rostrálisan az obextől, 2.7-3.2 mm a medulla dorzális felszínétől. Az elvezetéseket 3% biocytint tartalmazó oldattal megtöltött üveg mikroelektrodákkal végeztük. Az intracelluláris jeleket bridge módban rögzítettük, az adatok analízisét pedig a digitalizálást követően Spike2 és SigAve programok segítségével végeztük. A numerikus adatok statisztikai különbségét Mann-Whitney próbával vizsgáltuk. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában fejeztük ki. Az értékek eltérését  $p < 0.05$  szignifikancia szint mellett tekintettük jelentősnek.

### ***PAG Stimulálás***

A kísérletekben bipoláris rozsdamentes ingerlő elektródát helyeztünk a vl-PAG-ba a következő koordináták szerint: 0.5-0.8 mm a középvonaltól, 0.7-1.4 mm rostrálisan az interaurális vonaltól, 5.5-6.0 mm ventrálisan a dorzális felszíntől. Rövid sorozatingerlést követő hipotenzió mutatta, hogy az elektród a vl-PAG-ban van. Miközben intracellulárisan detektáltunk a RVM sejteiben 100-300  $\mu$ A –es egyes impulzusokkal ingereltünk.

### ***Perifériás Idegstimulálás***

A nervus ischadicust bipoláris ezüsthuzal elektródával ingereltük. A korábban kifejlesztett módszernek megfelelően az ingerlés erősségét 2  $\mu$ A-re állítottuk, hogy a mielinizált és a demielinizált axonokat is ingerelhessük. A sejtekből való elvezetés alatt 0.2 ms széles 1Hz frekvenciájú egyesingereket használtunk.

### ***Az Intracellulárisan Jelölt Sejtek Szöveti Feldolgozása***

A rekordált RVM sejtekbe az elektrofiziológiai karakterizálás után intracellulárisan biocytint injektáltunk, majd az állatokat transzkaridálisan fiziológiás sóoldattal, azt követően pedig foszfátpufferben (pH 7.4) oldott 4% paraformaldehid, 2% glutáraldehid oldattal perfundáltuk. Vibratómmal 40 µm-es koronális sorozatmetszeteket készítettünk a nyúltvelőből. A metszeteket ABC-vel inkubáltuk, majd a jelölt sejteket DAB stabilizált TMB reakcióval tetük láthatóvá. A jelölt idegsejteket NEUROLUCIDA 3D rekonstrukciós rendszerrel rekonstruáltuk.

## **Eredmények**

### ***A PHA-L jelölt axon terminálisok eloszlása a hídban és a nyúltvelőben.***

PHA-L-t unilaterálisan a PAG-be injektálva a hídban és a nyúltvelőben elszórtan axon terminálisok és varikozitások jelölődtek. Az azonos oldali végződések száma meghaladta az ellenoldalon találhatóakat. A terminálisok eloszlása az összes vizsgált állatban nagyon hasonló volt. A háromdimenziós rekonstrukcióhoz és a kvantitatív elemzéshez három, véletlenszerűen kiválasztott állat anyagát használtuk fel.

A híd rostrális részében a noradrenerg sejtcsoportban végződtek a jelölt axonok. A jelölés denzitása a ventrális és dorzális locus coeruleus és subcoeruleus területén volt a legnagyobb és alacsonyabb a locus subcoeruleus alfa alegységében valamint az A5-sejtcsoportban. Közepes sűrűséggel fordultak elő varikózus rostok a nucleus parabrachialis, laterodorzális tegmentális nucleus, nucleus reticularis pontis, nucleus motorius et principalis nervi trigemini és az oliva superiorban.

Jelentős mennyiségű axon terminális jelölődött az RVM-ben a híd kaudális és a nyúltvelő rostrális részén. Az RVM mellett a nucleus reticularis intermedius is sűrűn jelölődött axon terminálisokkal, és közepes mennyiségű varikozitás jelent meg a nucleus reticularis parvocellularisban valamint a nervus facialis motoros magjában.

Gyakorlatilag azonos denzitással jelölődtek nyúltvelő következő kaudális magjai: nucleus tractus solitarii, a Probst köteg magja, nucleus ambiguus, nucleus retroambiguus, nucleus reticularis ventrolateralis.

### ***A PHA-L jelölt terminálisok és a SIR neuronok kapcsolata***

A PHA-L és 5HT kettősjelölt metszetek kiértékelése azt mutatta, hogy az agyalap SIR neuronjainak közelében mérsékelt gyakorisággal végződnek PAG efferensek. A PAG-ból bemenetet fogadó 5HT sejtek döntően az RVM-ben voltak, de egy részük a híd rosztrális vagy a nyúltvelő kaudális végében volt. A pozitív végzódések 9-20% volt az RVM-ben, de itt is leginkább non-SIR területeken végződtek. Az összes terminálisnak csak 0.8%, 1.0%, 0.7%-a végződött az RVM-ben SIR idegsejtek közelében.

### ***A PHA-L jelölt terminálisok és a THIR neuronok kapcsolata***

Csak ritkán találtunk közeli kapcsolatot a PHA-L jelölt PAG efferensek és a TH immunoreaktív neuronok közt a híd és a nyúltvelő területén. A kapcsolatot fogadó sejtek nagyobb része a locus subcoeruleus ventrális részében és az A5-s sejtcsoportban volt. A végzódések 10-14%-a végződött a hídi noradrenerg sejteken, ahol a terminálisok leginkább non-THIR területeken végződtek. Az összes végződésnek csak 0.5%, 0.6%, 0.4%-a végződött THIR idegsejtek közelében a híd noradrenerg sejtcsoportjaiban.

### ***A vl-PAG végzódések neurokémiai jellemzése a pontomedulláris formatio reticularis középső részében***

Anatómiai megfigyeléseink szerint az agytörzsi magvak közül az iRF kap legerősebb beidegzést a vl-PAG-ból. Tekintettel arra, hogy ez a terület szerepet játszik a fájdalom magatartás kialakításában felmerült annak a lehetősége, hogy átkapcsolódási területként szerepelhet a vl-PAG és az RVM között. Emiatt elektronmikroszkóppal megvizsgáltuk a vl-PAG terminálisokat és posztzinaptikus targetjeiket az iRF területén. A mintákon posztembedding immunogold módszerrel vizsgáltuk a GABA és glicin immunoreaktivitást. Sem a PHA-L terminálisok, sem a targetjeik nem voltak GABA vagy glicin pozitívak.

Konfokális mikroszkóppal tovább tanulmányoztuk a vl-PAG végzódések posztzinaptikus profilját az iRF-ben, preproenkefalin (PPE) és glutamát dekarboxiláz (GAD) ellenes antitestekkel. Az elektronmikroszkópos eredményeinknek megfelelően nem találtunk vl-PAG terminálist GAD pozitív struktúrák közelében. Számos PHA-L pozitív

terminális létesített kapcsolatot PPE pozitív sejtekkel az Rgc-ben és a dorzális medulláris RF-ben.

### ***In vivo intracelluláris RVM elvezetések***

Tizennégy olyan RVM sejtől vezetünk el intracelluláris jeleket, melyek reagáltak az ellenkező oldali nervus ischiadicus ingerlésére. Mindegyikükről akciós potenciálokat rögzítettünk a nervus ischiadicus vagy a vl-PAG ingerlését követően. A 14 sejtől 8 izgalommal 6 pedig gátlással reagált a nervus ischiadicus ingerlésére. Az izgalmi és gátló posztszinaptikus potenciálok átlagos latenciája  $17.4 \pm 3$  és  $13.3 \pm 1.4$  ms volt ( $p < 0.28$ ). Az izgalmi válaszok átlag  $29.5 \pm 5.6$  ms-ig, míg a gátló válaszok valamivel tovább,  $78.5 \pm 22$  ms-ig tartottak. Tíz sejt esetén vizsgáltuk a hátsó végtagot érő fájdalmas ingerekre adott válaszokat, melyek megfeleltek a nervus ischiadicus ingerlésével kiváltható reakciónak.

### ***A ventrolaterális PAG ingerlése***

A vl-PAG ingerlésére 10 neuron (71%) izgalommal, 1 (7%) gátlással válaszolt és 3 (21%) esetén nem volt látható válasz. A késési idők alapján az izgalmi válaszok széles skálán mozogtak és jól korreláltak a nervus ischiadicus által kiváltható válaszokkal. 5 a nervus ischiadicus ingerlésére izgalommal reagáló sejt gyors excitatórikus bemenetet fogadott a vl-PAG-ból; a késési idők 1.8 és 6.9 ms közt változtak (átlagosan  $3.6 \pm 0.9$  ms), a tartamuk pedig  $6.2 \pm 1.5$  ms volt. A másik öt sejt esetén a késés sokkal nagyobb volt 10.4–26.4 ms (átlagosan  $14.8 \pm 3$  ms;  $p < 0.004$ ) a válaszok  $17.5 \pm 3.4$  ms-ig tartottak. Mind az öt késve reagáló idegsejt gátlással válaszolt a nervus ischiadicus ingerlésére.

### ***Az intracellulárisan jelölt RVM sejtek morfológiája és eloszlása***

Meghatároztuk a pontos helyzetét mind a 11 olyan neuronnak, melyek a nervus ischiadicus és a PAG felől is fogadtak bemeneteket. Az összes jelölt sejt az RVM-ben volt. Az orientációjuk, alakjuk, eloszlásuk és a dendritjeik megfeleltek a korábbi RVM intracelluláris munkákban leírtaknak.

## Megbeszélés

### *A ventrolaterális PAG efferensek végződési mintázata a hídban és a nyúltvelőben*

A PAG-ból eredő idegrostok és végződéseik eloszlását már sokan vizsgálták. Jelen kísérleti eredmények nagyrészt általában megfelelnek a korábban megfigyelteknek. Mindazonáltal olyan adatokhoz jutottunk, melyek segíthetnek megérteni a lehetséges funkcionális kapcsolatokat a PAG és az RVM, hídi noradrenerg magok, valamint az agytörzs más területei között. A korábbi eredményekkel szemben kimutattuk, hogy viszonylag kevés PAG efferens végződik SIR vagy THIR neuronokon az RVM-ben és a hídi noradrenerg magokban. Úgy találtuk, hogy a vl-PAG-ból származó axon terminálisok 20-30%-a a pontobulbáris RF intermedier területén végződik, sugallva, hogy ez a terület kiemelt szerepet játszhat a vl-PAG projekciói között.

Az irodalomban teljes az egyetértés, hogy a vl-PAG vetíti az RVM-be és a hídi noradrenerg sejtcsoportjaiba, így fejtve ki jelentős hatást a gerincvelő szomatomotoros és kardiovaszkuláris jelfeldolgozására. Az is ismert, hogy a PAG efferensek végződési mintázata az általunk vizsgált területeken különböző patkányfajták esetén igen változatos lehet. Eredményeink értékét növeli, hogy ismereteink szerint ez az első tanulmány Wistar-Kyoto patkányokon. Azt találtuk, hogy jelentősen vetíti a locus coeruleus ventrális és dorzális része, valamint a locus subcoeruleus felé, ugyanakkor a locus subcoeruleus alfa része és az A5-s sejtcsoport csak gyengén ellátott vl-PAG terminálisokkal a Wistar-Kyoto patkányokban. Másrészt az RVM-ben talált végzések nagyrésze a nucleus gigantocellularis pars alfa, valamint a nucleus paragigantocellularisban jelent meg, ugyanakkor a nucleus raphe magnusban és a dorzális paragigantocellularis magokban csak közepes sűrűséggel végződtek a jelölt axonok.

A leginkább elterjedt elmélet szerint, az RVM-be és a hídi noradrenerg magjaiban található spinális projekciós neuronokra NMDA és AMPA mechanizmusokon keresztül hatnak az oda vetítő vl-PAG neuronok. Emellett megmutattuk, hogy non-SIR sejtek is fogadnak monoszinaptikus kapcsolatot a vl-PAG-ból. Továbbá egy friss, a PAG stimuláció hatásait vizsgáló tanulmány nem találta bizonyítékát monoszinaptikus kapcsolatnak a PAG és az RVM SIR sejtjei között. Semmilyen módon nem sikerült SIR sejteket monoszinaptikusan aktiválniuk. Az általunk bemutatott kísérletek jól korrelálnak ezen

megfigyeléssel. A PAG efferensek nagy része az RVM non-SIR területein végződött és a jelölt terminálisok kevesebb, mint 10%-a végződött SIR sejtek közelében. Mindezek felvetik, hogy az RVM szerotoninerg sejtjeinek monoszínaptikus aktiválása nem valószínű, hogy szükséges lenne a PAG stimulálást követő nociceptív moduláló hatásokhoz, legalábbis Wistar-Kyoto patkányokban biztosan nem.

Azt is bemutattuk, hogy a vl-PAG és hídi THIR sejtek közt a direkt kapcsolat még az RVM/SIR kapcsolatnál is gyengébb. Leleteink szerint a híd noradrenerg magjaiban végződő vl-PAG efferensek kevesebb, mint 5%-a végződik THIR struktúrák közelében. Más munkák megerősítették leleteinket, mivel nem találtak jelentős projekciót a vl-PAG-ból a locus coeruleusba. A fentiek alapján szintén alig valószínű, hogy a híd noradrenerg sejtjeinek monoszínaptikus aktiválása alapvető lenne a vl-PAG gerincvelőre kifejtett hatásaiban.

Korábbi tanulmányok is említik, hogy a PAG kapcsolódik a pontobulbáris RF számos területéhez, ám ezeknek a kapcsolatoknak nem tulajdonítottak jelentőséget. Ezzel szemben szeretnénk kiemelni, hogy a vl-PAG beidegzi a ponto-medulláris intermedier retikuláris magot, a híd retikuláris magját és a híd parvocelluráris retikuláris magját, valamint a dorzális medulláris retikuláris területet. Tekintettel arra, hogy a PHA-L jelölt axonok 20-30%-a ezeken a területeken végződik meglehetősen valószínűnek tűnik, hogy a pontobulbáris hálózatos állomány ezen területei funkcionálisan fontos szerepet tölthetnek be a vl-PAG vetületei közt. Ismert ezekről a területekről, hogy szerepük van a fájdalom szabályozásában és vannak projekcióik a locus coeruleus és az RVM felé. Megfigyeléseink azt sejtetik, hogy ponto-bulbáris RF direkt vl-PAG bemenetet fogadó területei alapvető részei a leszálló szomatomotoros, kardiovaszkuláris és nociceptív rendszernek.

### ***A PAG által kiváltott posztszínaptikus válaszok in vivo intracelluláris vizsgálata az RVM neuronjaiban***

Morfológiai adatainkból egyértelműen kiderül, hogy a vl-PAG efferensek csak egy része végződik az RVM-ben, nagyrészüket az iRF-be vetül. Ebből, valamint más jelentésekből következik, hogy a vl-PAG ingerlése nem vezet az RVM spinálisan projektáló szerotoninerg sejtjeinek monoszínaptikus aktiválódásához, viszont a vl-PAG egy

komplex pontobulbáris neuronhálózatot aktivál, mely mono-, di- és poliszinaptikus kapcsolatban állhat az RVM-vel.

In vivo intracelluláris elvezetéssel tanulmányoztuk a szomatikus bemenettel rendelkező RVM sejtek vl-PAG által kiváltott posztszinaptikus válaszait. A PAG aktiválására reagáló sejtek több mint 90%-a excitatórikusan reagált a vl-PAG stimulálására. A válasz késleltetése alapján a sejteket két csoportra osztottuk. Az egyik korai, a másik késleltetett választ adott a vl-PAG stimulálását követően. Az egyes csoportokba sorolt neuronoknak eltérő volt a nervus ischiadicus ingerlésére adott válasza is. A vl-PAG ingerlést követően rövid latenciával aktiválódó sejtek mind excitatórikusan reagáltak a nervus ischiadicus ingerlésére. Ezzel szemben a hosszú latenciával válaszoló idegsejtek kivétel nélkül gátolták a nervus ischiadicus ingerlésének hatására. A válaszok eltérő késési ideje alátámasztja a mono-, di- és poliszinaptikus PAG–RVM pályák jelenlétét.

#### ***Az RVM neuronok rövid késési idejű válasza a ventrolaterális PAG ingerlése után***

Nagyon érdekes, hogy a rövid latenciájú vl-PAG bemenetet fogadó RVM idegsejtek izgalommal válaszoltak a nervus ischiadicus ingerlésére és a hátsó végtagot érő fájdalmas stimulusokra, amely viselkedés az ON sejtekre jellemző. Ez a felismerés felveti, hogy az vl-PAG-ból az RVM-be érkező monoszínaptikus efferensek főleg, vagy teljesen ON sejteken végződnek.

#### ***Az RVM neuronok hosszú késési idejű válasza a ventrolaterális PAG ingerlése után***

Néhány RVM neuron a vl-PAG ingerlésére csaknem négyszer nagyobb késéssel válaszolt, mint más vizsgált sejtek. A hosszú latencia arra utal, hogy a vl-PAG–RVM projekció összetett és a monoszínaptikus út mellett di- és poliszínaptikus pályákat is tartalmaz.

A hosszú válaszidejű neuronok gátlással válaszoltak a nervus ischiadicus ingerlésére és a hátsó végtagot érő fájdalmas stimulusokra, amely az OFF sejtekre jellemző. A felismerés, hogy a nervus ischiadicus ingerlésére eltérően válaszoló sejtek eltérő úton kapják bemenetüket a vl-PAG-ból, felveti, hogy a két csoport az idegsejtek funkcionálisan is eltérő csoportjába tartozik.

Ismert, hogy az OFF sejtek diszinhibícióval aktiválódnak. Szinte biztos, hogy a hosszú latenciájú vl-PAG bemenet lehet az egyik útja az RVM neuronok diszinhibíciós aktiválásának. A vl-PAG-ból leszálló rostok a RF-ben vagy az RVM-ben aktiválhatnak enkefalinerg neuronokat és ezek az aktivált enkefalinerg neuronok gátolhatják az RVM-t tónusos gátlás alatt tartó GABAerg idegsejteket. A az OFF sejtek fokozott aktivitása így lehet a gátlás alóli felszabadulás következménye.

### ***A ventrolaterális PAG efferensek posztzinaptikus targetjei a pontomedulláris formatio reticularisban***

Anatómiai megfigyeléseinkben úgy találtuk, hogy az iRF jelentős mennyiségű bemenetet fogad a vl-PAG-ból. Figyelembe véve a területek kapcsolatát az RVM-vel és a híd noradrenerg magjaival felvetődött annak a lehetősége, hogy az iRF átjátszóként működik, amin keresztül a vl-PAG képes modulálni az RVM és a hídi noradrenerg magok neuronális aktivitását.

Az RVM ON sejtjei serkentik, az OFF sejtek gátolják a nociceptív transzmissziót a gerincvelő hátsó szarvában. Ez a két sejtcsoport reciprok módon aktiválódik az esetek nagy részében. A kísérleti adatok szerint GABAerg inputok aktiválása felelős az OFF sejtek inaktiválásáért. Ha elfogadjuk a reciprok tüzelést, akkor az ON sejtek egy része mindenképpen olyan GABAerg interneuron kell, hogy legyen, mely gátolja az OFF sejteket. Az is lehetséges, hogy az OFF sejteket szabályozó GABAerg neuronok nem intrinsic, hanem extrinsic kapcsolatban vannak az RVM-vel. Mindazonáltal eredményeink alapján ez nem túl valószínű, hiszen a vl-PAG axon terminálisok targetjei az iRF-ben negatívak voltak GABA-ra és glinicare.

Az opioidok a GABA mellett szintén gátolhatják az OFF sejteket. Ezzel szemben már bebizonyították, hogy az opioidok aktiválják az RVM OFF sejtjeit és gátolják az ON sejteket. Valószínűleg a GABAerg inhibíció gátlásával indirekt módon jön létre az OFF sejtek opioid aktivációja. Az RVM gazdag enkefalint tartalmazó axon terminálisokban, melyek főleg ON sejteken végződnek. Így valószínűnek látszik, hogy az OFF sejtek ENK-GABA mediált diszinhibícióval aktiválódnak. Az RVM-en kívül található ENK pozitív sejtek kapcsolódhatnak GABAerg ON sejtekhez, melyek OFF sejtekre vetülnek. Ezáltal a GABAerg ON sejtek enkefalinerg gátlása diszinhibíciót, az OFF sejtek izgalmat

eredményezi. A fenti mechanizmusért felelős enkefalinergerg neuronok lehetnek az iRF-ben, hiszen ott masszív vl-PAG bemenetet fogadó PPE immunoreaktív neuronokat találtunk. Összegezve valószínű, hogy az iRF-ről úgy beszélhetünk, mint egy átkapcsoló terület a vl-PAG és az RVM közt, amely legalább részben diszinhibícióval modulálhatja a nociceptív jel feldolgozást és a fájdalmi magatartásokat.

## **Következtetések**

Eredményeink azt mutatják, hogy a vl-PAG aktivitása összetett interneuron hálózaton keresztül befolyásolhatja a gerincvelő fájdalom feldolgozó mechanizmusait. Az a legvalószínűbb, hogy a vl-PAG-ból érkező ingerületek alapvetően befolyásolják számos terület izgalmi szintjét (a ponto-medulláris RF mediális része, iRF, hídi nucleus reticularis, parvocellularis reticularis nucleus, dorzális medulláris retikuláris terület). Itt a PAG jelek aktiválhatnak a gerincvelő felé, vagy – nagyobb valószínűséggel – az RVM és a híd noradrenerg magjai irányába vetülő sejtek felé. A PAG efferensek másik csoportja az RVM-ben és a híd noradrenerg magjaiban non-serotoninergerg, non-noradrenerg idegsejteken végződik. Ezen sejtek egy része eredő sejtje lehet a raphespinalis, illetve coeruleospinalis pályáknak a többiek pedig lokális interneuronok. Az aktiválódott idegsejthálózatok tovább feldolgozzák a bejövő jeleket, majd spinálisan projektáló neuronokhoz vezetnek. Az efferensek harmadik csoportja monoszínaptikus kapcsolatban áll szerotoninergerg és noradrenerg sejtekkel, melyek lehetnek spinális projekciós neuronok. A gerincvelő felé vezető neuronok összegzik a szerotoninergerg, noradrenerg, non-szerotoninergerg, non-noradrenerg sejtek, valamint a mono- és di-/poliszínaptikus bemeneteket és küszöb feletti aktiválódásuk esetén jeleket küldenek a gerincvelő hátsó szarvába. A felszínes hátsó szarvban a végzések 5HT-t, NE-t, GABA-t, glicint és különféle neuropeptideket, mint az ENK bocsáthatnak ki, melyek gátolhatják a gerincvelői idegsejt hálózatokat, így vezetve analgéziához, a fájdalmi magatartás befolyásolásához.

## **Összefoglalás**

1. A RVM közvetlen, monoszínaptikus bemenete a vl-PAG felől nem olyan jelentős, mint ahogy azt korábban feltételezték. A vl-PAG efferenseknek csak 10-20%-a végződik az

RVM határain belül és kevesebb mint 5-10% alkot közvetlen kapcsolatot az RVM SIR sejtjeivel.

2. Szemben a korábbi tanulmányokkal megmutattuk, hogy az A5-7 noradrenerg sejtcsoportok alig kapnak bemenetet a vl-PAG felől. A vl-PAG efferensek csak 10-14%-a végződik a híd noradrenerg magjaiban és kevesebb, mint 5% kapcsolódik THIR neuronokhoz.
3. Kimutattuk, hogy a fájdalom magatartásért felelős, az RVM-be vetülő pontomedulláris formatio reticularis intermedier része jelentős bemenetet fogad a vl-PAG felől, ezáltal felmerült annak a lehetősége, hogy az iRF része egy alternatív di- és/vagy poliszinaptikus útvonalnak a vl-PAG és az RVM és a híd noradrenerg magjai közt.
4. Bizonyítottuk, hogy az RVM neuronjai heterogén, de főleg izgalmi bemenetet fogadnak a vl-PAG-ból. Ez alátámasztja az alternatív di- és/vagy poliszinaptikus útvonal jelenlétét a vl-PAG és az RVM közt. Az ON sejtek vélhetően monoszinaptikus, az OFF sejtek pedig indirekt (di- és/vagy poliszinaptikus) beidegzést kapnak a vl-PAG-ból.
5. Eredményeink alapján lehetséges, hogy az iRF egy olyan átkapcsoló hely, melyen keresztül a vl-PAG részben diszinhíbiós mechanizmusokkal hat az RVM-re és a híd noradrenerg magjaira.

## Közlemények jegyzéke

### *A dolgozathoz alapjául szolgáló közlemények*

- **Odeh F.** and Antal M.: The projections of the midbrain periaqueductal gray to the pons and medulla oblongata in rats, Eur. J. Neurosci., 14, 1275-1286, **2001**, **IF: 3.919**
- **Odeh, F.**, Antal, M. and Zagon, A.: Heterogeneous Synaptic Inputs from the Ventrolateral Periaqueductal Gray Matter to Neurons Responding to Somatosensory stimuli in the Rostral Ventromedial Medulla of Rats, Brain Res., (in press) **2002**, **IF: 2.489**

### *Egyéb közlemények*

- Szűcs P., **Odeh F.**, Szokol K. and Antal M.: Neurons with distinctive firing patterns, morphology and distribution in laminae V-VII of the neonatal rat lumbar spinal cord, Eur. J. Neurosci., (in press) **2002**, **IF: 3.919**

### *Absztraktok*

1. **Odeh, F.** and Antal, M.: The projection of the midbrain periaqueductal gray to serotonergic and noradrenergic nuclei of the pons and medulla oblongata in the rat. Neurobiology: 6. 235-236 (**1998**)
2. Antal, M. and **Odeh, F.**: The projection of the midbrain periaqueductal gray to serotonergic and noradrenergic nuclei of the pons and medulla oblongata in the rat. Eur. J. Neurosci., 10, Supp. 10, 218 (**1998**)
3. **Odeh, F.** and Antal, M.: Brainstem targets of projecting fibers arising from the ventrolateral column of the midbrain Periaqueductal gray in the rat. Neurobiology: 7. 362 (**1999**)
4. Antal, M. and **Odeh, F.**: The projections of the midbrain periaqueductal gray to serotonergic and noradrenergic nuclei of the pons and medulla oblongata in the rat. Abst. Soc. Neurosci.25, 1674 (**1999**)

5. **Odeh, F.** and Antal, M.: GABA and glycine immunoreactivity of axon terminals arising from the midbrain periaqueductal gray and their postsynaptic targets in the pontobulbar reticular formation of rats. *Eur. J. Neurosci.*, 12, Supp. 11. 72 (2000)
6. Zagon, A. and **Odeh, F.**: Variations in the excitatory inputs from the midbrain periaqueductal gray matter to nociceptive modulatory neurons of the rostral ventromedial medulla in the rat. *J. Physiol.*, London, 531, 137 (2001)
7. **Odeh, F.**, Zagon, A. and Antal, M.: Effects of electrical stimulation of the midbrain periaqueductal gray matter on intracellular recorded and labeled neurons in the rostral ventromedial medulla. *Neurobiology*: (2001)
8. Szűcs, P., **Odeh, F.**, Szokol, K. and Antal, M.: Electrophysiological and morphological characteristics of neurons in the intermediate gray matter (laminae V-VII) of the neonatal rat lumbar spinal cord in vitro. *Neurobiology*: (2002)
9. **Odeh, F.**, Antal, M. and Zagon, A.: Heterogeneous excitatory inputs from the ventrolateral periaqueductal gray matter to neurons responding to somatosensory stimuli in the rostral ventromedial medulla of rats. *Eur. J. Neurosci.*: (2002)
10. Szűcs, P., **Odeh, F.**, Szokol, K. and Antal, M.: Electrophysiological and morphological characteristics of neurons in the intermediate gray matter (laminae V-VII) of the neonatal rat lumbar spinal cord in vitro. *Eur. J. Neurosci.*: (2002)