

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

A felületes hátsó szarv laterális szélén, valamint a nucleus spinalis lateralis-ban (LSN) elhelyezkedő neuronok anatómiai jellemzői és propriospinalis kapcsolataik elektrofiziológiai vizsgálata, patkány gerincevelő lumbális szakaszán

dr. Antal Zsófia

Témavezető: Dr. Szücs Péter, PhD



DEBRECENI EGYETEM

IDEGTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2015

**A felületes hátsó szarv laterális szélén, valamint a nucleus spinalis
lateralis-ban (LSN) elhelyezkedő neuronok anatómiai jellemzői és
propriospinalis kapcsolataik elektrofiziológiai vizsgálata, patkány
gerincvelő lumbális szakaszán**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: dr. Antal Zsófia általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Idegtudományi Doktori Iskolája
keretében

Témavezető: Dr. Szücs Péter, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

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

tagok: Prof. Dr. Bíró Tamás, az MTA doktora

Dr. Puskár Zita, PhD

A doktori szigorlat helye és időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Neurológiai
Tanszék, könyvtár, 2015. március 16. 11.00

Az értekezés bírálói: Prof. Dr. Deolinda Lima, MD, PhD
Dr. Puskár Zita, PhD

A bíráló bizottság:

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

tagok: Prof. Dr. Bíró Tamás, az MTA doktora

Prof. Dr. Deolinda Lima, MD, PhD

Dr. Puskár Zita, PhD

Dr. Tóth Attila, az MTA doktora

Az értekezés védésének helye és időpontja: Debreceni Egyetem, ÁOK,
Belgyógyászati Intézet „A” épület, tanterem, 2015. június 3. 13.00.

BEVEZETÉS

Az emberiséget az idők kezdete óta foglalkoztatják a fájdalom csillapításának lehetőségei, és a mai napig ez az orvostudomány egyik fő feladata. A fájdalomcsillapítás bármely betegség gyógyítása során kiegészítheti a terápiát, mert javítja a beteg közérzetét, fokozza együttműködését és lehetővé teszi sebészeti beavatkozások elvégzését. Ugyanakkor egyes betegségek végsátdiumában gyakran a fájdalomcsillapítás az egyetlen dolog, amit egy orvos a betegéért tehet. Ennek ellenére, az ideális analgetikum kidolgozása, a tudomány forradalmi újításai ellenére a modern technológia korában is várat magára.

Ahhoz, hogy a modern fájdalomcsillapító eljárások fejlesztése terén előreléphessünk, elengedhetetlen, hogy magát a fájdalomérző rendszert a lehető legrészletesebben megismerjük. Minél jobban megértjük a fájdalmas ingerület feldolgozását szolgáló rendszert, annál több lehetőségünk lesz a beavatkozásra. Ebben az ingerületfeldolgozó rendszerben a gerincvelőre sokáig mint egyszerű relé állomásra tekintettek, melynek az egyedüli feladata az információ továbbítása a perifériáról a magasabb rendű agyi központok felé. Ma azonban már tudjuk, hogy a gerincvelő végzi a nociceptív ingerület elsődleges feldolgozását ennek keretében pedig koordinációs, szabályozó és modulatív funkciókat is ellát. Melzack és Wall kapukontroll elméletének 1965-ös publikálása óta a fájdalomérző rendszerre irányuló kutatások egyik fő területévé a hátsó szarvi neuronhálózatok működésének vizsgálata vált. A gerincvelő hátsó szarvi neuron-populációk minél alaposabb megismerése, neurokémiai és elektrofiziológiai karakterének felderítése segíthet az általuk létrehozott neuronális hálózatok működésének és ezek nociceptív ingerületfeldolgozásban betöltött pontos szerepének megértésében. Ez az ismeretanyag kitűntetett jeletőséggel bírhat olyan specifikus és hatékony fájdalomcsillapító eljárások fejlesztésében, melyeknek kevesebb vagy elhanyagolható magasabb rendű központi idegrendszeri mellékhatása van.

ELMÉLETI HÁTTÉR, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A gerincvelő szürkeállománya mellső- és hátsó szarvra osztható. Míg az előbbi motoros funkciókat lát el, az utóbbinak a szenzoros ingerületfeldolgozásban van szerepe. A szürkeállomány cytoarchitektonikai sajátosságai alapján tíz laminára osztható, melyek közül az I-es lamina és a II-es lamina dorsalis kétharmada (IIo) alkotja a felületes hátsó szarvat. Itt végződnek azok primer afferens rostok, melyek a nociceptív információt szállítják a perifériáról, így ez a terület kiemelt jelentőséggel bír a fájdalomérzésben. A vékony myelinizált és myelinizálatlan rostok által szállított információt a felületes hátsó szarvi interneuronok (local-circuit neuron, LCN) dolgozzák fel, ezt követően pedig projekciós neuronok (PN) továbbítják azt a szupraspinális központok felé. A projekciós neuronok axonjai képezik a gerincvelői felszálló fájdalomérző pályákat, melyek közül legjelentősebb az anterolaterális rendszer (anterolateral tract, ALT).

Az elmúlt évtizedekben különböző szerzők számos, a felületes hátsó szarvi neuronális összeköttetések működését feltárni hivatott hipotetikus neuronhálózati modellt írtak le. Ezek a modellek elsősorban a II-es lamina neuronjaira fókuszáltak, és azt feltételezték, hogy a nociceptív ingerületfeldolgozást lokális, szegmentális neuronhálózatok végzik, melyek nem állnak kapcsolatban a gerincvelő más területeivel. Ugyanakkor az utóbbi években egyre több kísérletes adat látszik alátámasztani Szentágothai korábbi axon-degenerációs vizsgálatokkal szerzett eredményeit, melyek rövid- és hosszab távú longitudinális propriospinális kapcsolatokról számolnak be. Petkó és mtsai. axonjelölési technikákkal vizsgálták és igazolták ezen propriospinális kapcsolatokat, és eredményeik rámutattak, hogy a gerincvelő hátsó szarvi laterális területein a propriospinális kapcsolatok jóval kiterjedtebbek mint a mediális területeken.

Szücs és mtsai. morfológiai vizsgálatainak eredményei szerint a laterális propriospinális kapcsolatok egy részét az I-es lamina bizonyos projekciós neuronjainak (LCT-PN) laterális kollaterálisai alkotják, míg további jelentős hányadukat feltehetőleg interneuronok adják. Sajnálatos módon azonban, főként technikai okokból adódóan, nem elérhető ezen interneuronok olyan részletes morfológiai leírása, amely alátámaszthatná ezt a feltevést.

Az intenzíven kutatott felületes hátsó szarvi neuronok mellett a meglehetősen negligált nucleus spinalis lateralis (LSN) képezheti a laterális

propriospinális kapcsolatok másik célpontját. Az LSN a dorsolateralis funiculus (DLF) területén elszórt neuronokból áll, és egy folyamatos magoszlopot képez a hátsó szarvtól ventrolaterálisan, mely az agytörzs-gerincvelői átmenettől a sacralis gerincvelőszegmentumokig tart. Axonjelölési technikákkal végzett kísérleti eredmények azt mutatják, hogy az LSN neuronjai számos, a szomatoszenzoros illetve nociceptív ingerületfeldolgozásban résztvevő, szupraspinális központtal állnak közvetlen kapcsolatban. Az LSN neuronjai vetítenek pl. a nucleus parabrachialis, a periaqueductalis szürkeállomány, a nucleus tractus solitarii, a medullaris formatio reticularis, a nucleus accumbens, a septum, az amygdala valamint az orbitalis kéreg felé, diencephalikus célpontjaik között pedig egyaránt szerepel a hypothalamus és a thalamus. A felületes hátsó szarvval ellentétben az LSN bilaterálisan vetít a thalamus mediodorsalis magcsoportjához, és egyes szerzők szerint ennek a pályának is szerepe lehet a fájdalom emocionális és kognitív összetevőinek kialakításában. Ezek az irodalmi adatok mind azt mutatják, hogy az LSN neuronjainak többsége projekciós sejt, és ezt a feltevést támasztja alá Réthelyi morfológiai leírása is, mely szerint az LSN neuronjainak axonja röviddel eredésük után myelinizálttá válik. A szupraspinalis központok mellett az LSN az I-es II-es, V-ös és VII-es lamina neuronjaival is kapcsolatban áll. Réthelyi beszámol továbbá arról is, hogy az LSN neuronjai kettősen jelölhetők az agytörzs és a diencephalon, valamint az agytörzs és a gerincvelő területén injektált jelölőanyagokkal, ami felveti annak a lehetőségét, hogy ezek a sejtek axon kollaterálisaikon keresztül propriospinalis kapcsolatokat is létesítenek.

Az LSN területén számottevő mennyiségű peptiderg varikozitást írtak le, melyek száma nem változott sem dorsalis rhizotomiát, sem a leszálló pályák experimentális lézióját követően, ezért feltételezhetjük, hogy az LSN neuronjai szinaptikus bemeneteik többségét azonos vagy szomszédos szegmentumokban elhelyezkedő gerincvelői interneuronok adják. Ugyanakkor az I-es lamina projekciós sejtjeinek egy része is rendelkezik olyan axon kollaterálisokkal, melyek a dorsolateralis funiculusban szinaptikus kapcsolatokat létesíthetnek az LSN neuronjaival, bár ezidáig ilyen kapcsolatok jelenlétét elektrofiziológiai vizsgálatokkal nem erősítették meg.

A felületes hátsó szarvval ellentétben az LSN neuronjairól rendelkezésünkre álló morfológiai ismeretek igen hiányosak. Annak ellenére, hogy az LSN neuronjainak többsége feltételezhetően projekciós neuron, semmit sem tudunk

például axonjaik gerincvelői lefutásáról, holott kollaterális ágakon keresztül ezek a neuronok is kialakíthatnak propriospinális kapcsolatokat.

Az interszegmentális propriospinalis kapcsolatok vizsgálatának elengedhetetlen eleme a páros elektrofiziológiai elvezetés. Az elektrofiziológiai kísérletekben jellemzően alkalmazott vékony szeltpreparátumok technikai korlátai miatt azonban, ezidáig csak sporadikus, döntően in vivo kísérletekből származó eredmények állnak rendelkezésre. A közelmúltban kidolgozott ferde felszíni infravörös LED (IR-LED) megvilágítási technika ugyanakkor alkalmas a felületes neuronok fehérállományon keresztüli tanulmányozására, így sikeresen alkalmazható intakt lumbális gerincvelői blokkpreparátumok in vitro vizsgálatára. A blokkpreparátumban nem csak a rövid- és hosszú távú, rostrocaudalis kiterjedésű propriospinalis kapcsolatok vizsgálata válik lehetővé, de az egyedi intracelluláris neuronjelölés határfoka is javítható, mert a jelölt sejt nyúlványai, ellentétben a szeletpreparátumban tapasztaltakal, nem csonkolódnak. A hátsó szarvi neuronhálózatok vizsgálatának hatékonysága tovább növelhető amennyiben a páros elvezetések során a preszinaptikus sejtet ún. sejt-kapcsolt stimulációval ingereljük. Ez a megközelítés a hagyományos kettős elvezetésekkel összehasonlítva jóval nagyobb számú preszinaptikus neuron tesztelését teszi lehetővé.

A ferde felszíni infravörös megvilágítás illetve az ún. sejt-kapcsolt preszinaptikus stimulációs technika kombinációját alkalmazva intakt, lumbális gerincvelői blokkpreparátumokon egy igen hatékony eszköz áll rendelkezésünkre a propriospinális neuronhálózatok kutatására.

CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink során fő célunk a latero-lateralis propriospinális kapcsolatok kombinált elektrofiziológiai és morfológiai módszerekkel való vizsgálata, illetve az ezeket a kapcsolatokat kialakító neuronális elemek azonosítása és tanulmányozása volt.

- a) Az I-es lamina interneuronjairól olyan alapos morfológiai tanulmányt kívántunk készíteni, mely magában foglalja az axon kiterjedésének, elágazódási mintázatának és lehetséges célterületeinek leírását, ezáltal segíthet megbecsülni lehetséges szerepüket a propriospinális kapcsolatok létesítésében.
- b) Ezt követően *in vitro* elektrofiziológiai eszközökkel kívántuk vizsgálni az I-es lamina és az LSN neuronjai által fogadott latero-lateralis propriospinális kapcsolatokat.
- c) Végül kihasználva az elektrofiziológiai módszerek adta intracelluláris egyedi neuronjelölés lehetőséget, vizsgálni kívántuk az LSN neuronok morfológiai sajátosságait, különös tekintettel azok axon-lefutási mintázatára.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Az I-es lamina és az LSN neuronjainak leképezése

Kísérleteinkhez P14-21 korú laboratóriumi Wistar patkányok gerincvelőjét távolítottuk el, amit a mérések megkezdéséig szobahőmérsékletű oxigenizált mesterséges agy-gerincvelői folyadékban (ACSF) tartottuk. A gerincvelő lumbalis szegmentumát, cianoakrilát alapú ragasztó segítségével, a dorsolatrealis felszínnel felfelé egy aranylemezhez rögzítettük.

A vizsgálni kívánt neuronokat egy 40x-es nagyítású immerziós objektívvel felszerelt Zeiss Axioskop FS (Carl Zeiss Microscopy, USA) típusú mikroszkóppal tettük láthatóvá ferde infravörös LED megvilágítás és egy CCD kamera (Hamamatsu, Japán) segítségével. Az I-es lamina laterális részének azonosításában a véletenszerű irányultságot mutató rostok között elhelyezkedő, átlagosan 20 μm nagyságú, elszórt sejtek azonosítása segített. Az LSN-t az I-es laminától ventrolaterálisan volt fellelhető, jellemzően nagyméretű neuronok alkotják, melyek párhuzamosan rendezett, rostrocaudalis lefutású rostok között elszórtan találhatóak.

Elektrofiziológiai mérések és intracelluláris neuronjelölés

Kísérleteink során neuronpárokat vizsgáltunk, melyek közül az I-es lamina leglaterálisabb részén vagy az LSN területén elhelyezkedő posztszinaptikus sejt aktivitását teljes-sejt patch-clamp technikával regisztráltuk. A kísérlet teljes időtartama alatt oxigenizált ACSF-et áramoltattunk keresztül a mérőkamrán; ennek összetétele a következő volt: NaCl 115mM, KCl 3mM, CaCl_2 2mM, MgCl_2 1mM, NaH_2PO_4 1mM, NaHCO_3 25 mM és glükóz 11mM (az oldatot O_2 és CO_2 95%-5% arányú keverékével buborékolattuk, amíg elérte a 7,4-es pH értéket).

Az elektrofiziológiai mérésekhez használt pipettákat vastag falú boroszilikát kapillárisokból (BioMedical Instruments, Németország) készítettük vertikális (Narishige PC-10, Japán) vagy horizontális (Sutter P-97, USA) pipetta-húzó készülék segítségével. Ezt követően a pipetták hegyét egy erre a célra kialakított készülék (Narishige Microforge MF-830) segítségével políroztuk, hogy végső ellenállásuk 4-5 M Ω között legyen.

A pipettákban található intracelluláris oldat összetétele a következő volt: KCl 3mM, kálium-glükonát 150 mM, MgCl₂ 1 mM, BAPTA 1mM, Hepes 10 mM. Az oldat pH-ját KOH-dal 7,3-es értékre titráltuk. Az oldat végső K⁺ koncentrációja 160 mM volt. Az intracelluláris oldathoz minden kísérlet kezdetén biocytint (0,5-1%) adtunk. Annak érdekében, hogy a jelölőanyag minél hatékonyabban feltöltse a vékonyabb neuronális nyúlványokat, az elektrofiziológiai mérések kezdetén és végén egyaránt depolarizáló lépésekből álló protokollt alkalmaztunk.

A kísérletek döntő részét a portói Instituto Biologia Molecular e Celular – ban (IBMC, Rua do Campo Alegre 823, 4150-180 Porto, Portugália) végeztük, ahol EPC10-Double (Heka, Németország) típusú erősítőt használtunk, míg a további kísérletek során, a Debreceni Egyetem Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetében egy Axopatch 1D típusú erősítőt használtunk (Axon Instruments, USA). Az elvezetett szignált 2.9 kHz-en low-pass filterrel szűrtük, a mintavételezés 10 kHz-es frekvenciával történt. Az offset potenciálokat a nagy ellenállású kapcsolat kialakítása előtt kompenzáltuk. A folyadék junctionos potenciál értékét kiszámoltuk (15 mV) és az erősítő kompenzációs áramkörén keresztül korrigáltuk.

A potenciális preszinaptikus neuronokat az I-es lamina területén kerestük, a posztszinaptikus sejttől egy-két látótérre mediálisan és egy-hét látótérre caudalisan. Miután a posztszinaptikus sejttel kialakítottuk az elvezetéshez szükséges teljes-sejt konfigurációt, a látótér caudalis részén feljegyeztünk két-három, a tájékozódást segítő struktúrát, majd az objektívet caudalis irányba mozgattuk míg a tájékozódási pontok a látótér rostralis végén eltűntek. A preszinaptikus jelölt neuronokat az ilyen módon azonosított, egymással szomszédos látóterekben kerestük. Egy látótér hossza a mikroszkóp és kamera beállításai mellett a mi esetünkben kb. 180 μm volt.

Kísérleteink során a sejt-kapcsolt stimuláló pipettát 500 mM-os NaCl oldattal töltöttük fel, melyhez a kísérlet elején 1,5% biocytint adtunk. A potenciális preszinaptikus sejteket sejt-kapcsolt konfigurációban 1 Hz-es frekvenciával stimuláltuk 1ms hosszú, 100 nA erősségű árammal EPC10-Double (Heka, Németország) vagy Axoclamp 2B (Axon Instrments, USA) erősítő segítségével.

Monoszínaptikusan kapcsolt neuronpárok azonosítása

A monoszínaptikusan kapcsolt neuronpárok azonosítására használt protokollban a preszínaptikus stimulust (100 nA, 1 ms) megelőzően és azt követően is 200 ms-on keresztül feszültség-zár üzemmódban vezettünk el az esetleges posztzínaptikus sejtről. Az esetek egy részében a stimulus előtti időtartam ennél rövidebb, 20 ms volt. A protokollt 90-szer ismételtük meg, 1 Hz-es frekvenciával. A regisztrátumokat a kísérletet követően értékeltük, elemezve, hogy a preszínaptikus stimulus hogyan befolyásolta az excitatorikus posztzínaptikus áramok (EPSC) számát. A kiváltott válasz latenciáját az 1 ms-os preszínaptikus stimulus végétől a kiváltott EPSC maximális amplitúdója 10%-ának eléréséig számítottuk. A stimulust megelőző, illetve azt követő szakaszon az EPSC-ket automatikusan detektáltuk MiniAnalysis (Synaptosoft, USA) szoftver segítségével. A posztzínaptikus választ akkor tekintettük monoszínaptikusnak, ha a latenciaidők varianciája, alacsony kihagyási arány („failure rate”) mellett, 4 ms-on belül volt. Ezeket a kritériumokat irodalmi adatok alapján állítottuk fel, Santos és mtsai. ugyanis kimutatták, hogy az I-es lamina neuronjai több, eltérő távolságú axodendritikus kapcsolatot létesíthetnek egymással, emiatt a monoszínaptikus EPSC-k különböző komponenseinek latenciái lényegesen különbözhetnek. A kiváltott válaszok monoszínaptikus voltát az egyes EPSC komponensek közötti esetleges átmenetek detektálásával is megerősítettük. Azon regisztrátumok esetében, melyeket az Axopatch 1D erősítő segítségével vezettünk el, a preszínaptikus stimulációt Axoclamp 2B erősítő (Molecular Devices, USA) segítségével végeztük.

Hisztokémiai feldolgozás

A preparátumokat legalább 72 órán keresztül fixáltuk 4%-os paraformaldehid oldatban. A fixálást követően a gerincvelőt agargélbe ágyaztuk és 100 µm vastagságú sagittális vagy transzverzális metszeteket készítettünk egy VT 1000S típusú (Leica, Németország) vibratome segítségével. Ezt követően a metszeteket 50%-os etanollal permeabilizáltuk, majd a biocytint ExtrAvidin-peroxidázzal (1:1,000 hígítás; Sigma) való konjugálás után diaminobenzidin (DAB) kromogén reakcióval tettük láthatóvá. A metszetek egy részének esetében 1%-os

toluidinkék oldatos háttérfestést alkalmaztunk, majd dehidrációt követően DPX (Fluka, Svájc) segítségével fedtük le őket. A metszetek másik részét 1%-os OsO_4 oldatos inkubálást követően epoxi-rezinbe (Durcupan; Fluka, Svájc) ágyasztuk. A metszetekről egy Guppy típusú (Allied Vision Technologies, Németország) kamerával felszerelt, Primo Star (Carl Zeiss Microscopy, USA) mikroszkóp segítségével 10x-es és 40x-es objektívvel készítettünk felvételeket. A fényerősséget és a kontrasztot a disszertációban bemutatott összes felvételen az Adobe Photoshop szoftver segítségével állítottuk be.

A jelölt neuronok 3-D rekonstrukciója és analízise

A teljes neuronokra és gerincvelői kontúrokra kiterjedő 3-D rekonstrukciókat sorozatmetszetek alapján készítettük el Neurolucida (MBF Bioscience, USA) segítségével.

A sorozatmetszeteket 40x-es objektívet használva egyenként megrajzoltunk, majd az egyes metszetekről készített rajzokat a szómát tartalmazó metszettől kiindulva egymáshoz igazítottuk és az illeszkedő pontokat összekötöttük. A rezinbe ágyazott metszetek esetében a hisztokémiai feldolgozás következtében a metszetek vastagsága (Z tengely mentén mért kiterjedése) az eredeti 100 μm 80-90%-ára csökkent. Mivel ez hasonló mértékű volt mint az X és Y tengely mentén tapasztalt zsugorodás, ezekben az esetekben korrekciót nem alkalmaztunk. A DPX-be ágyazott metszeteknél a Z tengely menti zsugorodás nagyobb mértékű volt, ezért ezekben az esetekben a metszet vastagságát 80 μm -re korrigáltuk, hogy arányos legyen az X és Y tengely menti értékkel és a rekonstrukciók összevethetőek legyenek.

A morfometriai analízist és az alapvető kvantitatív jellemzők mérését (Sholl analízis, dendrit szegment hossz kalkuláció, tüskék száma és denzitása, Fan-in analízis) a Neurolucida Explorer (MBF Bioscience, USA) program segítségével végeztük.

Varikozitás-eloszlás és akciós potenciál terjedési idő kalkulálása és megjelenítése

A rekonstruált interneuronok axonján bizonyos térfüggő vizuálizált morfometriai analíziseket elvégeztetéséhez saját fejlesztésű, a Blender 3D modellező

szoftverbe integrálódó, Python programnyelven készített programot használtunk (Py3DN; <https://sourceforge.net/projects/py3dn/>). A rekonstrukciós adatokat a program a Neurolucida fileből konvertálta, hogy a Python programozói környezetben felhasználhatók és Blender 3D-ben megjeleníthetők legyenek

Az axon minden egyes pontjára kiszámítottuk, hogy mennyi időbe telik amíg egy az iniciális szegmentumból kiinduló feltételezett akciós potenciál eléri azt. Feltételezve, hogy minden egyes axonszegmentum vezetési sebessége a hosszától és az átmérőjétől függ, a terjedési idő (δ) a következő egyenlettel írható le: $\delta = l/(kd)$, ahol l a szegmentum hossza, k konstans (10 m/s myelinizált és 380 m/s myelinizálatlan rostok esetében), d pedig a rostátmérő. A rostátmérőnek azt a küszöbértékét, amely felett az axon myelinizálnak tekinthető elektronmikroszkópos mérések alapján határoztuk meg. Az akciós potenciál terjedési idejét az axon minden egyes pontján színkóddal jelenítettük meg.

Elektron mikroszkópia

Az elektron mikroszkópiára szánt gerincvelőket paraformaldehid-glutáraldehid 4%-0.1%-os keverékében fixáltuk, VT1000S típusú (Leica, Németország) vibratómmal 100 μ m vastagságú metszeteket készítettünk belőlük, ezt követően pedig a metszeteket folyékony nitrogénnel permeabilizáltuk. A biocytint a HRP-DAB protokoll szerint hívtuk elő (*részletesen ld.: Hisztokémiai feldolgozás*), majd a metszeteket 1%-os OsO_4 oldatban utófixáltuk, dehidráltuk, végül epoxi-rezinbe (Durcupan; Fluka, Svájc) ágyasztuk.

A vizsgálni kívánt területet kivágtuk és ultravékony metszetek készítése céljából újra beágyasztuk. A metszeteket a kontraszt fokozása érdekében ólom-citráttal és uranil-acetáttal kezeltük, majd egy JEM 1400 TEM típusú elektronmikroszkóppal (JEOL, Japán) vizsgáltuk. A biocytinnel töltött axonprofilokról SC1000 Orius típusú (Gatan, Usa) CCD kamera segítségével készítettünk felvételeket 20,000x vagy 50,000x-es nagyítás mellett.

Statisztikai analízis

A statisztikai analíziseket a SigmaStat 3.0 (Systat Software, USA) szoftver segítségével végeztük. Az I-es lamina laterális területein kívül eső és az LSN területén elhelyezkedő neuronok morfológiai analízise során talált különbségeket Student t-próba vagy Mann-Whitney teszt alkalmazásával vizsgáltuk. Az EPSC kinetika összehasonlítását az egyes csoportok között a Kruskal-Wallis próba és a Dunn módszer szerint végeztük. Azokat a különbségeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, ahol $p < 0.05$ értéket kaptunk.

A számértékeket átlag $\pm$ SEM formájában tüntettük fel.

EREDMÉNYEK

I-es lamina interneuronok morfológiája

Kutatócsoportunk 82 sejt vizsgálata alapján készített részletes leírást az I-es lamina interneuronjairól. A sejtek közül 13 esetében komplett 3-D rekonstrukciót is végeztünk, ami további analízisek elvégzését tette lehetővé.

Az axon kiterjedése

Az I-es lamina interneuronjainak legszembevetőbb közös tulajdonsága, hogy míg ipsilaterálisan számos helyi, varikózus axonkollaterálissal rendelkeznek, addig az ellenkező oldalra nem adnak ágat.

Az interneuronok axonja az esetek többségében egy 100-120 μm vastagságú sávot foglalt el a szürkeállomány dorsalis részén, amely a felületes hátsó szarv állományának felel meg. Az axon esetenként mélyebbre terjedve a III-as laminát is elérte. Míg a jelölt axon mediolaterális és dorsoventralis kiterjedése átlagosan $636 \pm 27 \mu\text{m}$ és $295 \pm 41 \mu\text{m}$ volt, a rostrocaudalis kiterjedése szignifikánsan nagyobbak, mintegy $2312 \pm 116 \mu\text{m}$ -nek bizonyult, ami a kísérletekhez felhasznált életkorú patkányokon két-három gerincvelői szegmentumnak felel meg. A lokális axonhálózat vagy a sejttest köré rendeződött, vagy rostrocaudalis irányban elnyúlt. Néhány, az I-es lamina leglaterálisabb részén elhelyezkedő interneuron esetében az axon döntő része mediálisan helyezkedett el, a sejttestől több tíz mikrométeres távolságban.

A fentiekben leírt lokális axonfelhő mellett az I-es lamina interneuronok többsége egy vagy több, esetenként varikózus, máskor myelinizált megjelenésű különálló axon-ággal rendelkezett, amelyek a szomszédos fehérállomány területén, így pl. a Lissauer kötegben, a dorsalis- (DF), a dorsolateralis- (DLF) és a laterális funiculusbán (LF) futottak. Ezen elkülönült ágak további, különböző sűrűségű varikózus, myelinizálatlan kollaterálist adtak a fő axonfelhőtől disztálisan. Utóbbi ágak jelenléte miatt végeztük el a későbbiekben az axon finomszerkezetének és szerveződésének a vizsgálatát.

Az I-es lamina interneuronok elágazódási mintázata és varikozitás-eloszlása

A vizsgált neuronok egy részében a fő axon csak három-négy elsődleges ágat adott le melyek közül a proximálisak domináltak. Más esetekben a fő axon akár hét primer ágat is adott, és ezeknél a távolabbi ágak foglaltak el nagyobb területet. Minden esetben jellemző volt azonban a primer ágak célterületei közötti kisebb-nagyobb átfedés.

A varikozitás-eloszlási térképek, a fizikális távolság mérésekkel és a Sholl analízis eredményei alapján az I-es lamina interneuron axonok legtöbb varikozitása a sejttest közelében, de nem feltétlenül akörül volt megtalálható. Az esetek egy részében a varikozitások száma és sűrűsége a sejttestől távolodva fokozatosan csökkent. Ugyanakkor voltak olyan interneuronok a mintánkban, amelyek a sejttest 500 μm -es környezetében kevesebb varikozitással bírtak, de attól távolodva, további lokális akkumulációt mutattak, esetenként több száz mikrométeres távolságban a rostrocaudalis vagy mediolateralis tengely mentén.

Az I-es lamina interneuronok axonjának finomszerkezete és ezek hatása az akciós potenciál terjedési idejére

Az a megfigyelésünk, hogy vastagabb, myelinizált megjelenésű axonokból esetenként távoli, vékony, varikózus kollaterálisok eredtek, felvetette annak a lehetőségét, hogy a különböző megjelenésű szakaszok finomszerkezete eltérő lehet. A kérdés tisztázására, egy jellegzetes axonterületről, ahol mindkét típus megfigyelhető volt, elektronmikroszkópos felvételeket készítettünk. Vizsgálataink alapján a myelinizált megjelenésű axonprofilok kivétel nélkül több, koncentrikus rétegben elhelyezkedő myelinhüvellyel bírtak. Ezek átmérője $760 \pm 28 \text{ nm}$ ($n=24$) illetve $453 \pm 18 \text{ nm}$ volt myelinhüvellyel és anélkül. Ugyanakkor a varikózus axonprofilok esetében mind a varikozitások területén, mind a varikozitások közötti szakaszokon hiányzott a myelinhüvely. Ezeknek a profiloknak az átmérője átlagosan $311 \pm 10 \text{ nm}$ volt.

Ahhoz, hogy meghatározhassuk, hogy a különböző axonszegmentumok hogyan járulnak hozzá az akciós potenciál terjedéséhez, egy Python nyelven elkészített programot használtunk, mely segítségével lehetőségünk nyílt az axon mentén az akciós potenciál terjedési idejének feltérképezésére. Az elektronmikroszkópos felvételek alapján meghatározott átmérők átlagértékei és

hisztogramjai alapján meghatároztunk egy 0,35 μm -es küszöbértéket, ami felett az axont myelinizálnak tekintettük. A vezetési sebességet 0,38 m/s-nak vettük a myelinizált és 10 m/s -nak a myelinizálatlan szegmentumok esetében. Az akciós potenciál maximális terjedési ideje szemmel láthatóan lecsökkent abban az esetben, amikor a 0,35 μm feletti átmérőjű rostokat myelinizálnak tekintettük, ahhoz képest, amikor minden szegmentumot myelinizálatlannak tekintettük. Azon interneuronok esetében, melyek távoli végelágazási területekkel bírtak, a maximális terjedési értékek 20%-kal csökkentek.

A lumbalis gerincvelő lateralis propriospinalis kapcsolatai

A propriospinalis kapcsolatok vizsgálata során az I-es lamina leglateralisabb részén és a LSN területén összesen 86 sejtről végeztünk elektrofiziológiai elvezetést teljes sejt konfigurációban. Bár az elektrofiziológiai kísérleteket követően minden esetben megkíséreltük a biocytinnel jelölt neuronok előhívását, ezt csak 32 esetben tudtuk teljes mértékben kivitelezni (37%-os siker ráta), ami lehetővé tette ezen sejtek axonjának és szomatodendritikus doménjének pontos lokalizációját és klasszifikációját.

Szinaptikus kapcsolatok

A 86 teljes-sejt elvezetésből 54 esetben kíséreltünk meg preszinaptikus stimulációt, összesen 241 potenciális preszinaptikus neuron stimulálásával (egy posztszinaptikus jelölt esetében legalább 1, legfeljebb 18 preszinaptikust teszteltünk). A legtöbb esetben az esetleges preszinaptikus sejteket a posztszinaptikus jelölttől caudalisan elhelyezkedő első három látótérben kerestük. 224 esetben a preszinaptikus stimuláció nem váltott ki semmilyen választ a posztszinaptikus jelölt sejten. Ezekben az esetekben az esetleges mono- vagy poliszinaptikus kapcsolat hiányát a posztszinaptikus neuronról, a stimulust megelőző és azt követő 200 ms-os periódusban elvezetett EPSC-k frekvenciájának változatlansága is megerősítette. A tapasztaltakat úgy értékeltük, hogy ezek között a neuronpárok között nem volt szinaptikus kapcsolat.

12 esetben a preszinaptikus neuron stimulációja egy stabilan kiváltható EPSC-t eredményezett a posztszinaptikus sejten melynek a latenciája átlagosan 5.7 ± 1.5 ms ($n=12$, latencia tartomány: 1.7 - 19.8 ms), amplitudója pedig átlagosan $30.7 \pm$

5.2 pA ($n=12$, átlagértékek tartománya: 6.6 – 63.4 pA) volt. A kiváltott válasz a posztszinaptikus sejten a stimulust követő 50 ms-os időintervallumban jelzett EPSC frekvencia emelkedést eredményezett. A monoszinaptikusan kapcsolt neuronpárok előfordulási gyakorisága akkor volt a legnagyobb, amikor az esetleges preszinaptikus sejtet a posztszinaptikus neuron melletti első caudálisan eső látótérben kerestük, és előfordulási gyakoriságuk a posztszinaptikus sejttől caudalis irányban távolodva fokozatosan csökkent. A legtávolabbi monoszinaptikusan kapcsolt neuronpár négy látótér távolságba helyezkedett el (720 μm) egymástól. Ez a távolság megközelíti egy rövidebb lumbalis gerincvelői szegmentum hosszát fiatal patkányban.

A preszinaptikus stimuláció, további 5 esetben, nagy mértékű EPSC frekvencia emelkedést eredményezett a posztszinaptikus neuronon, ami több száz ms-on keresztül fennállt további stimuláció nélkül is. Ezeknek a kapcsolatoknak a hátterében feltehetőleg poliszinaptikus serkentő neuronhálózatok aktivációja állhat, ezért ezeket a kapcsolatokat poliszinaptikusnak neveztük a későbbiekben. A gyakran egymásra épülő, összetett EPSC-k komplex kinetikája miatt ezeknél a kapcsolatoknál nem tudtunk monoszinaptikus komponenst azonosítani. Amikor a stimulus utáni intervallumban előforduló EPSC-k számát normalizáltuk a stimulus előtti szakaszra, azt tapasztaltuk, hogy az EPSC-k gyakorisága a stimulust követő 50 ms-os tartományban volt a legmagasabb és a későbbiekben fokozatosan csökkent, szemben a monoszinaptikus kapcsolatoknál az első 50 ms-os tartományban tapasztalt kiugró értékkel.

A poliszinaptikus kapcsolatok hatékonysága, elektrofiziológiai tulajdonságai

Az előzőekben leírt protokollt megismételtük áram-zár üzemmódban is. Az egymást követő excitatorikus posztszinaptikus potenciálok (EPSP-k) már -90 mV-os értékről is képesek voltak olyan mértékben megemelni a posztszinaptikus sejt membránpotenciálját, hogy az elérte az akciós potenciál kialakulásához szükséges küszöbértéket. A preszinaptikus sejt stimulálása a -80 mV-os, a nyugalmi membránpotenciált közelítő feszültségérték mellett akciós potenciál sorozatot generált a posztszinaptikus sejten. Az így kiváltott akciós potenciál sorozat frekvenciája azonban szemmel láthatóan kisebb volt, mint a közvetlenül a sejttestbe injektált áramimpulzus által kiváltott, hasonlóan 10-15 mV-nyi amplitúdójú sorozat esetében.

A preszinaptikus stimulus utáni intervallumot normalizálva a stimulus előtti időszakra, az akciós potenciálok száma ötszörös emelkedést mutatott.

Az I-es lamina laterális szélén és az LSN területén elhelyezkedő neuronok morfológiája

A felületes hátsó szarvtól laterálisan elhelyezkedő neuronok szomatodendritikus struktúrájának általános jellemzői

A 32 sikeresen előhívott jelölt neuron közül mindössze 5 helyezkedett el az I-es lamina határain belül. A többi sejt az I-es lamina laterális széle mellett, a DLF felszínes rostjai között (n=18) vagy az LSN területén (n=9) helyezkedett el. Míg az I-es lamina neuronjai csoportosíthatóak voltak a Lima és Coimbra által bevezetett klasszifikáció szerint, azok a neuronok, melyek laterálisabban, a felületes hátsó szarvi szürkeállományon kívül és az LSN területén helyezkedtek el (három sejt kivételével), az előbbiektől igen eltérő szomatodendritikus jellegzetességeket mutattak.

Utóbbi sejtek alapvető morfometriai paramétereit ezért egy projekciós- (Luz és mtsai.) és saját eredményeinkből származó interneuronokról készült 3-D rekonstrukciókból készült összevont mintával hasonlítottuk össze. Azoknak a neuronoknak, melyek a felületes hátsó szarvi szürkeállományon kívül, illetve az LSN területén helyezkedtek el, több primer dendritjük volt, és az összesített dendrit hosszuk is szignifikánsan nagyobbak bizonyult. Ez a különbség az I-es laminán kívül eső neuronok esetében egy általában véve “bozontosabb” megjelenést eredményezett. A másik szembevetendő különbség az I-es laminán kívül eső neuronok esetében a szignifikánsan nagyobb számú és denzitású, rövid dendrittüske jelenléte volt, melyek néhány esetben a sejttesten is előfordultak.

Az I-es laminán kívül és az LSN területén elhelyezkedő neuronok jellegzetes axonlefutási mintázattal bírnak

A sejttest elhelyezkedésétől függetlenül, az előhívott neuronok axonlefutási útvonalai tekintetében egymástól jól elkülönülő csoportokat alkottak. A 32 sejtet tartalmazó mintából 16-ot a szakirodalomban megtalálható kritériumrendszer alapján be tudunk sorolni interneuronok vagy projekciós neuronok egyes alcsoportjai közé.

További 7 esetben a fő axon a commissura posterior területén keresztezte a középvonalat és ezt követően az ellenkező oldali columna anterior mediális részén szállt fel.

Egy másik neuroncsoport esetében a fő axon hasonlóképpen a commissura dorsalis területén kereszteződött, azonban ezt követően a commissura anterior területén visszakereszteződött, és a szürkeállományt elhagyva az ipsilateralis funiculus anterior mediális területén folytatta útját.

Végül a maradék négy sejt esetében azt tapasztaltuk, hogy a fő axonból, ami az ellenkező oldali ALT-ben szállt fel, mielőtt a commissura anteriorban keresztezte volna a középvonalat, további két hosszú ág vált le, melyek közül az egyik az azonos oldali DLF vagy DF területén szállt fel, a másik pedig, ami a myelinizálatlan kollaterálisok jellemzőit mutatta, az azonos oldali DLF-ban folytatta útját caudalis irányba.

A commissura posteriorban kereszteződő és ellenkező oldalon felszálló axonnal bíró neuronok

Az ebbe a csoportba tartozó neuronok dendritfája egy szferikus strukturát alkotott, melynek a sejttest nem annyira a középpontjában, mint inkább a felszínéhez közel helyezkedett el. A primer dendritek multipoláris módon eredtek a szómából, és főleg a DLF területén ágaztak el. A dendritek már a sejttest közelében is sűrűn elágazódtak, ezért azok szegmenthossza általában rövid volt.

Ebben a csoportban jellemző volt a nagy számú, rövid dendrittüske is. A fan-in analízis eredménye szerint a dendritfa nem mutatott orientációs preferenciát, egyenletesen töltötte ki a sejttest körül rendelkezésre álló teret.

Az axon ezen sejtek esetében mediálisan eredt az egyik primer dendritről vagy közvetlenül a szómáról. Ezt követően mediál felé haladva lépett be a szürkeállomány területére, ahol a canalis centralis irányában folytatta útját, a commissura posteriorban keresztezte a középvonalat, majd ventral felé kanyarodott és a szürkeállományból kilépve az ellenkező oldali columna anterior mediális részén szállt fel. A fő axon az ipsilateralis oldalon adott elszórt kollaterálisokat, többek között a X-es laminához

Ezen sejtek szórványosan kaptak spontán szinaptikus bemeneteket, melyek elnyújtott kinetikájú, nagy amplitúdójú EPSP-k és EPSC-k voltak, és nem mutattak szummációt.

A középvonalat kétszer keresztező, ipsilateralisan felszálló axonú neuronok

Az ebbe a csoportba tartozó 5 neuronra is sűrűn elágazódó dendritfa volt jellemző, mely számos dendrittüskével bírt, noha ezek száma alacsonyabb volt mint az előző csoportban. Ugyanakkor a dendritfa ebben az esetben korlátozottabb orientációt mutatott, a dendritek vagy dorsalis irányba kanyarodtak és többnyire az I-es és II-es laminában helyezkedve követték a felületes hátsó szarv dorsalis görbületét, vagy ventrális irányba kanyarodva a DLF területén ágaztak el. A fan-in analízis ennek megfelelően fokozott halmozódást mutatott 90° körül.

A fő axon ezeknél a neuronoknál is mediális irányban eredt és a commissura posteriorban keresztezte először a középvonalat. Ezt követően az ellenkező oldalon visszakanyarodott és a commissura anteriorban ismét keresztezte a középvonalat, majd az azonos oldali columna anterior mediális részén folytatta az útját rostralis irányban. A fő axon jellemző módon az azonos oldali, mély hátsó szarvi laminák területén és a canalis centralis közelében, a X-es laminában adott kollaterális ágakat, azonban egyik esetben sem figyeltünk meg kollaterálisokat a felületes hátsó szarvban.

A spontán szinaptikus bemenetek gyakoribbak voltak, mint az előző csoportban, mind az EPSP-k, mind az EPSC-k gyorsabb kinetikát és alkalmanként szummációt mutattak.

Bilaterálisan vetítő neuronok

Végül 4 jelölt neuron esetében a fő axonból, a commissura anteriorban való kereszteződése előtt, egy azonos erősségű, myelinizált ág vált le, ami az azonos oldali DLF vagy DF területén szállt fel. Emellett jellemző volt egy ipsilateralis, vékony kollaterális jelenléte is, ami számos varikozitással bírt és a DLF vagy a Lissauer köteg területén caudalis irányban haladt.

A dendritfa ezekben az esetekben meglehetősen aszimmetrikus volt, legtöbb ága egy kúp alakú területet foglalt el a DLF területén, míg mindössze egyetlen dendrit haladt mediális irányba. Ezt a kúp alakú elrendeződést a fan-in analízis is megerősítette, melyen kifejezett halmozódást tapasztaltunk 90°-nál. A dendritek általában nagyobb kiterjedésűek voltak, és ritkábban ágaztak el mint az előző két csoport esetében, ami kevesebb, hosszú dendritszegmentumot eredményezett. Emellett a dendrittüskék száma is alacsonyabb volt mint az előző két esetben.

Annak ellenére azonban, hogy ezeknek a neuronoknak kevés dendrittüskéje volt, a spontán szinaptikus bemenetek frekvenciája magasnak bizonyult; számos nagy

amplitúdójú EPSP-t és EPSC-t vezettünk el ezekről a neuronokról, melyek gyakori szummációt mutattak.

Különbségek a spontán szinaptikus bemenetek frekvenciájában és kinetikájában a különböző morfológiájú neuroncsoportok között

Ahhoz, hogy a spontán szinaptikus bemenetek (sEPSP-k és sEPSC-k) frekvenciája tekintetében megfigyelt különbségeket statisztikailag analizálni tudjuk, az egyes neuronokról készült elvezetések közül kiválasztottunk 10-10, 200-800 ms hosszúságú olyan rekordot, amelyek alatt a preszinaptikus sejtet még nem stimuláltuk. Az sEPSC-k frekvenciáját kiszámoltuk mindegyik elvezetés esetén és ezeket összesített adathalmaz formájában jelenítettük meg a megfelelő csoport esetén. A statisztikai analízis bizonyította, hogy a bilaterálisan vetítő neuronok átlagos frekvenciája (23.4 ± 2.1 Hz) szignifikánsan magasabb volt ($p < 0.05$, Dunn módszer, Kruskal-Wallis próbát követően) mint a másik két neuroncsoport esetén.

Az sEPSP-k és sEPSC-k kinetikájának összehasonlító vizsgálatához 7-30 db-ot választottunk ki mindkét fajta posztzinaptikus eseményből, a különböző morfológiai csoportokba eső minden egyes neuron esetén. Az sEPSC-eket a regisztrátumok preszinaptikus stimuláció előtti szakaszáról, míg sEPSP-eket az áramzár üzemmódban felvett tüzelési mintázat protokoll 0 pA injektálása mellett felvett regisztrátumáról vettük. Az sEPSC-k átlagos amplitúdója szignifikánsan ($p < 0.05$, Dunn módszer, Kruskal-Wallis próbát követően) kisebb volt a középvonalat kétszer keresztező, azonos oldalon felszálló axonú neuronok esetében, mint a másik két csoportban, az sEPSP-k átlagos amplitúdója ugyanakkor nem mutatott szignifikáns különbséget. Az amplitúdó maximumának eléréséhez szükséges átlagos idő a bilaterálisan vetítő neuronokról elvezett sEPSC-k és sEPSP-k esetében egyaránt szignifikánsan rövidebb ($p < 0.05$, Dunn módszer, Kruskal-Wallis próbát követően) volt.

DISZKUSSZIÓ

A mellékelt publikációkban bemutatott és ebben a tézisfüzetben összefoglalt eredményeink azt mutatják, hogy az I-es lamina interneuronok gyakran adnak rövid és feltehetőleg hosszabb propriospinalis axon ágakat. Ez a jellemzőjük morfológiai bizonyítékot szolgáltat arra, hogy egyaránt részt vehetnek a szenzoros információ szegmentális interlamináris és propriospinális feldolgozásában. Kísérleteinkkel azt a hipotézist vizsgáltuk, hogy a DLF rostralis irányú rostjai, melyek magukban foglalják a projekciós neuronok kollaterálisait és az interneuronok helyi axonjait, szinaptikus bemenetet szolgáltathatnak a laterális I-es lamina illetve az LSN neuronjai számára. Bizonyítottuk, hogy az I-es lamina laterális neuronjainak stimulációja valóban kiválthat mono-, és poliszinaptikus válaszokat az LSN és az I-es lamina leglateralisabb neuronjain, jóllehet ezek a kapcsolatok ritkák voltak. Másfelől a laterális hátsó szarvi neuronok körültekintő három dimenziós rekonstrukciójával olyan axonlefutási mintázatokat fedeztünk fel, melyek eddig nem szerepeltek a szakirodalomban.

Az interneuronok lehetséges szerepe a hátsó szarvi lokális neuronhálózatokban

Az interneuronok axonjának elágazódási mintázata alapján feltételezhetjük, hogy ezek a sejtek nem csak a beérkező nociceptív információ feldolgozásáért és más bemeneti forrásokkal való integrálásáért felelősek, hanem a primer afferensek mellett további divergenciát biztosíthatnak a szomatoszenzoros rendszerben. Továbbá, mivel az interneuronok axonja a hátsó szarvi laminák többségében megtalálható (I-II, esetenként III-IV), ez a jellemzőjük elméletileg lehetőséget teremt arra, hogy a C típusú rostok által szállított információt a mélyebb laminák felé továbbítsák. Így a III-V-ös laminákban elhelyezkedő neuronok integrálhatják a közvetlenül primer afferensek felől érkező bemenetet az interneuronok felől érkező, indirekt, már feldolgozott szenzoros információval.

Ugyanakkor az interneuronok axonjának igen nagy kiterjedése alapján feltételezhető az is, hogy viszonylag kevés interneuron képes lehet hosszan tartóan és több szegmentumot érintően a felületes hátsó szarv működésének befolyásolására. Az

axon sűrű elágazódása és a nagy számú varikozitás azt feltételezi, hogy ezek az idegsejtek volumentranszmisszióban is részt vehetnek.

Az interneuronok lehetséges szerepe a rövid- és hosszú propriospinális hálózatokban

Az interneuronok nagy hányada rendelkezett különálló, hosszú axonágakkal a DF, DLF és a Lissauer köteg területén, melyek gyakran myelinizált megjelenést mutattak. Ezek az ágak gyakran két-három szegmentumon keresztül is követhetőek voltak a rostrocaudalis irányban. II-es és III-as lamina neuronok esetében már leírtak hasonló axon kollaterálisokat a dorsolateralis fehérállományban, és kolinerg neuronok esetében, melyek hasonló rostrocaudalis irányú axonszerveződést mutattak és a közelmúltban a szakirodalomban felvetették annak a lehetőségét, hogy ezek a neuronok interszegmentális integratív funkciót töltenek be. Hasonlóképpen, az általunk vizsgált I-es lamina interneuronok morfológiai sajátosságai is arra utalnak, hogy ezek a neuronok ugyancsak részt vehetnek rövid, és néhány esetben hosszú propriospinális kapcsolatok kialakításában egyaránt.

Azt is meg kell jegyeznünk, hogy az I-es lamina projekciós neuronjai és az interneuronok hasonló arányban adnak varikózus axon-kollaterálisokat a DLF területén (az interneuronok 39%-a, a projekció neuronok 40%-a). Összefoglalva tehát azt mondhatjuk, hogy a korábban már leírt II-es és III-as lamina neuronok mellett az I-es lamina interneuronjai és projekciós neuronjai is hozzájárulhatnak a lokális, szegmentális szenzoros információ szomszédos szegmentumok felé történő továbbításához.

Az I-es lamina interneuronok axon szerveződésének funkcionális következményei: elágazódási mintázat, varikozitás eloszlás és akciós potenciál időbeli terjedésének feltérképezése

Az interneuronok varikozitások ezrével bíró komplex axonja, valószínűleg fontos szerepet tölt be a szinaptikus bemenetek időbeli elosztásában, a nagyfokú szomatotopiát mutató gerincvelői hátsó szarvban. Az iniciális szegmentumon

kialakuló akciós potenciál terjedési idejét az axon mentén elsősorban a fizikális távolság, az axon átmérője, myelinizáltsága és elágazódási mintázata határozza meg.

Az axon adott pontjának fizikális távolsága az iniciális szegmentumtól nagy mértékben függ az elágazódási mintázattól. A vizsgálataink során gyakran megfigyelt, fő axonból rostralis és caudalis irányba alternáló módon elágazódó primer kollaterálisok hatékony megoldást nyújthatnak a célterület, az I - III-as lamina maximális lefedésére. Ez az elrendeződés kiegyenlíti az axon rostralisán és caudalisán futó ágait érintő, fizikális távolságból adódó különbségeket, ugyanakkor a fő ágak közötti átfedést is eredményez. Így azok a célterületek, melyeket több, átfedő kollaterális is ellát, egymás után többször is aktiválódhatnak.

Az I-es lamina és az LSN nem túl gyakori rövid, interszegmentális kapcsolatai közül némelyek igen hatékonyak

Elektrofiziológiai kísérleteink azt mutatták, hogy a felületes hátsó szarvi szürkeállományán kívül és az LSN területén elhelyezkedő neuronok monoszaptikus kapcsolatokat fogadnak az I-es lamina laterális részén elhelyezkedő neuronoktól. A szinaptikusan kapcsolt neuronpárok ritkák voltak, és legfeljebb 720 μm -es távolságban voltak megfigyelhetők. Kísérleti állataink életkora miatt ez a távolság nagyjából megegyezik a felső lumbalis gerincvelői szegmentumok hosszával, ezért ezek a kapcsolatok interszegmentálisnak tekinthetők. Az ilyen, ultra rövid, propriospinális kapcsolatok tovább fokozhatják a primer afferens inputok komplex gerincvelői konvergenciáját és divergenciáját.

Meglepő megfigyelésünk volt ugyanakkor a néhány, DLF területén elhelyezkedő neuron esetében tapasztalt erőteljes, poliszinaptikus excitáció. Az I-es lamina területén elhelyezkedő egyetlen preszinaptikus sejt stimulációja is elegendő volt a posztzinaptikus sejt hosszan tartó, az akciós potenciál küszöbértékét meghaladó depolarizációjához. A jelenség hátterében egy olyan neuronhálózat állhat, ami serkentő neuronok sorozatán keresztül terjeszti és felerősíti egyetlen „iniciátor” sejt aktivitását. A másik lehetséges magyarázat a dizinhibíció lehet, így a normál körülmények között inaktív idegsejtek, felszabadulva a gátlás alól, megemelhetik a vizsgált neuronról elvezetett EPSC-k frekvenciáját. Az irányító szerepet betöltő „iniciátor” sejtek valószínűleg az I-es lamina kiterjedt axonfelhővel és varikozitások

ezrével bíró serkentő illetve gátló interneuronjai, melyek kiterjedt axonja több gerincvelői szegmentumot is áthidalhat, ezáltal hátsó szarv nagy területén képesek magas serkentő vagy gátló neurotranszmitter szintet biztosítani.

A hátsó szarv laterális szélén elhelyezkedő neuronok a szinaptikus integráció morfológiai jeleit mutatják

Öt sejt kivételével, az általunk jelölt neuronok többsége a felületes hátsó szarvi szürkeállományon kívül esett. Ezek közül néhány egyértelműen az LSN területén helyezkedett el, míg a többi hátsó szarvi szürkeállomány és az LSN közötti területen volt megtalálható.

A dendritek elrendeződése ezeknél a sejteknél általában jelentősen különbözött az I-es lamina projekciós neuronjai és interneuronjai esetében korábban leírtaktól. A sejtek többsége aszimmetrikus megjelenésű volt, dendritjeik többsége ventrolaterális irányban, a DLF területén ágazott el, és csak néhány haladt mediális irányban, a felszínhez közel az I-es lamina területén.

A dendritfa DLF területén jellemző sűrű elágazódása mellett, a laterális sejtek nagy számú dendrittuskét is tartalmaztak, tovább növelve a lehetséges kontakt felület nagyságát. A DLF keresztmetszetének ilyen módon történő hatékony lefedése alátámasztja azt a korábbi irodalmi felvetést, hogy az LSN integratív központ szerepét töltheti be, és az itt található neuronok zsigeri primer afferenseket, illetve interneuronoktól és szupraspinalis központok felől leszálló bemeneteket is fogadhatnak.

A felületes hátsó szarvi szürkeállományon kívül elhelyezkedő neuronok axonjának jellegzetességei

A szakirodalomban számos morfológiai adat található, melyek azt bizonyítják, hogy az LSN sejtjeinek többsége projekciós neuron. Ezt támasztja alá Réthelyi azon megfigyelése is, miszerint az LSN neuronok axonja röviddel az eredését követően myelinizálttá válik, ami a projekciós axonok általános jellemzője. Hasonlóképpen a mi megfigyeléseink szerint is a hátsó szarvi szürkeállományon

kívül elhelyezkedő neuronok többsége (27-ből 24), köztük az LSN neuronjai is, myelinizált megjelenésű projekciós axonnal bírtak. A projekciós axon 20 esetben számos kollaterálist adott az azonos oldali hátsó szarvi szürkeállomány szinte minden laminájában.

Korábbi leírásokhoz hasonlóan az axon dendritikus eredete ezeknél a neuronoknál is gyakori volt. A sejttesttől egyik legtávolabb (~90 μm) eső axon eredést egy bilaterálisan vetítő neuron esetében figyeltük meg. Ebben a konkrét esetben az axon egy, a sejttesttől távol eső, kezdetben mediális irányba haladó, majd visszakanyargó dendritből ágazott el. Ez a megfigyelésünk megerősíti azt a korábbi számítógépes modellkísérletek eredményein alapuló feltevést, hogy a dendritnek, melyről az axon leválk, mind a proximális, mind a disztális szakasza fontos szabályozó szereppel bírhat az akciós potenciál iniciációjában. Egy közelmúltban megjelent tanulmány szerzői erre funkcionális bizonyítékokat is szolgáltatottak.

A felületes hátsó szarvi szürkeállományon kívül elhelyezkedő neuronok a commissura posteriorban is kereszteződhetnek

Az axon középvonali kereszteződését, gerincvelői szinten szabályozó molekuláris mechanizmusokat széles körben tanulmányozták. Számos olyan, a padlólemez és a tetőlemez által termelt kemorepellens és kemoattraktáns faktort írtak le, amelyek egymás utáni sorrendben és egymás hatását kiegészítő módon irányítják a fejlődő idegrendszerben növekvő axont.

Míg korábbi morfológiai leírások szerint az I-es lamina projekciós sejtjei kivétel nélkül a commissura anteriorban keresztezték a középvonalat, a felületes hátsó szarvi szürkeállományon kívül eső neuronok ettől eltérő axonlefutási mintázatot mutattak. A fő axon 7 esetben a commissura posteriorban kereszteződött és a columna anterior fehérállományának mediális részén szállt fel. A commissura posteriorban történő középvonali kereszteződés ezen neuronok esetében valószínűleg a növekvő axonkúp, irányító faktorokkal szembeni eltérő érzékenységeinek az eredménye. Elképzelhető ugyanakkor az is, hogy ezen sejtek axonja később kezd fejlődni mint a felületes hátsó szarvi neuronoké és lekési azt az időablakot, amely a hagyományos, commissura anterior irányában történő kereszteződést teszi lehetővé.

Ezen neuronok célterületeinek és pontos funkciójának megismeréséhez anterográd axonjelölési technikával végzett, további kísérletek szükségesek.

A középvnalat kétszer keresztező, ipsilateralisan vetítő neuronok axon lefutási mintázata ellentmond a fejlődő axon középvnali kereszteződését irányító mechanizmusokról meglévő jelenlegi ismereteinknek

Megfigyelésünk, miszerint a jelölt neuronok közül 5 axonja kétszer keresztezte a középvnalat, nem összeegyeztethető a fejlődő axonok középvnali kereszteződését irányító folyamatokról jelenleg az irodalomban fellelhető ismeretekkel. A középvnali kereszteződést a commissura anteriorban a padlólemez által expresszált kemoattraktánsok, pl. a Netrin-1 és Sonic Hedgehog irányítják. Miután az axon átkereszteződött, a Slit és Semaphorin családba tartozó kemorepellens faktorok megakadályozzák az axon újbóli középvnali kereszteződését, és egyben segítik a fehérállományba való kilépését.

Eredményeink ugyanakkor, az irodalomban először, bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy vannak olyan ipsilateralis projekciós axonok, melyek a középvnalat kétszer keresztezik: először a commissura posteriorban, majd az ellenoldali szürkeállományban való rövid lefutás után másodszor a commissura anteriorban. Megfigyeléseink tehát, a növekvő axon középvnali kereszteződését irányító eddig ismeretlen faktorok és mechanizmusok léteire utalnak. Az ebbe a csoportba tartozó neuronok fejlődéstani eredetének vizsgálata és további axonjelölési kísérletek szükségesek ahhoz, hogy feltárjuk eredetüket és funkciójukat.

Bilaterálisan vetítő neuronok

A commissura posteriorban kereszteződő és a középvnalat kétszer átszelő neuronok mellett az általunk jelölt sejtek között 4 olyan volt, melyek bifurkáló, myelinizált megjelenésű axonnal bírtak. A fő axon a hátsó szarvi szürkeállomány területén ágazott ketté, és míg az egyik ág követte az I-es lamina projekciós neuronjai esetében korábban leírt hagyományos útvonalat, a másik, azonos erősségű, szintén myelinizált ág az azonos oldali DLF-ban szállt fel. Bár az I-es lamina neuronok

között korábban már leírtak olyanokat, melyek bilaterálisan vetítettek, ezekben az esetekben a középvonalat keresztező kollaterális a szupraspinális területeken vált le. Az általunk leírt bilaterálisan vetítő neuronok axonja azonban jóval korábban válik ketté, mindkét axonág szemmel láthatóan azonos erősségű és két különböző pályarendszerhez csatlakozva száll fel.

Az LSN neuronok egy részének esetében korábban már leírták, hogy kettősen jelölhetőek az agytörzs és a diencephalon, valamint az agytörzs és a gerincvelő felől. Ez felvetette annak a lehetőségét, hogy az LSN neuronjai kollaterális ágakon keresztül propriospinális kapcsolatok létesítésében vehetnek részt.

A lumbosacralis és felső nyaki gerincvelői szegmentumok közötti hosszú távú propriospinalis összeköttetéseket cholera toxin beta-alegységgel (CTB) végzett retrográd axonjelölési technikával vizsgálva ugyancsak beszámoltak néhány lumbális felületes hátsó szarvi neuron jelölődéséről. Ezekről a hosszú, propriospinális összeköttetésekről azt feltételezik, hogy a fej és a nyak mozgásait koordinálják helyváltoztatás és motoros reflexek során. Mindemellett a felső nyaki szegmentumok LSN neuronjai jelölhetőek a felső thorakális szegmentumok felől, ahogyan a középső thorakális szegmentumok intermediolaterális magja is jelölhető a felső nyaki szegmentumok területén elhelyezkedő LSN neuronok anterográd jelölésével. Ez a fajta propriospinalis összeköttetés magyarázható az általunk jelölt bilaterálisan vetítő neurontípus esetében a DLF és a Lissauer köteg területén megfigyelt vékony caudalis irányban futó kollaterálisokkal.

KULCSSZAVAK

gerincvelő, hátsó szarv, nucleus spinalis lateralis, hátsó szarvi neuronhálózatok, 3-D sejtreakonstrukció, projekciós neuron, interneuron, axon lefutási mintázat

ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatási eredményeink szerint az I-es lamina interneuronjainak axonja gyakran igen kiterjedt kollaterális hálózattal bír dorsolateralis fehérállományban és ebből következően, az I-es lamina egyes projekciós neuronjai mellett, potenciálisan alkalmasak rövid- és hosszútávú intraszegmentális és interszegmentális propriospinális kapcsolatok kialakítására. Elektrofiziológiai módszerekkel sikerült kimutatnunk ilyen propriospinális kapcsolatokat az I-es lamina projekciós neuronjai és interneuronjai valamint más I-es lamina illetve LSN sejt között. Annak ellenére, hogy ezen kapcsolatok nem gyakoriak, néhányuk kivételesen hatékonynak bizonyult. Ez utóbbi kapcsolatok külön jelentőséggel bírhatnak a patológiás körülmények között jellemző, módosult nociceptív transzmisszióban.

A fenti eredmények mellett, kutatásaink során egyedi axon lefutási mintázattal bíró, valószínűleg projekciós neuronokat azonosítottunk a felületes hátsó szarv laterális területén és az LSN-ben. Ezen újonnan leírt axon lefutási mintázatok eltérnek az I-es lamina területén korábban megfigyeltektől, és azoktól eltérő fejlődési útvonalakat feltételeznek. Bár az LSN nem található meg minden fajban, az általunk leírt jellegzetes axonlefutási minták segíthetnek azonosítani az LSN-nel azonos eredetű és analóg funkciójú neuroncsoportokat más fajokban, pl. az emberben.

Eredményeink hangsúlyozzák, hogy a gerincvelői szintű szenzoros információ feldolgozás folyamatának megfejtéséhez elengedhetetlen a felületes hátsó szarvi neuronhálózatok összeköttetéseinek megismerése és megértése.



Nyilvántartási szám: DEENK/85/2015.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Antal Zsófia
Neptun kód: Z6HJML
Doktori Iskola: Idegtudományi Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10034814

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Antal, Z.**, Luz, L.L., Safronov, B.V., Antal, M., Szűcs, P.: Neurons in the lateral part of the lumbar spinal cord show distinct novel axon trajectories and are excited by short propriospinal ascending inputs.
Brain Struct. Funct. "accepted by publisher" (2015)
IF:4.567 (2013)
2. Szűcs, P., Luz, L., Pinho, R., Aguiar, P., **Antal, Z.**, Tiong, S., Todd, A.J., Safronov, B.: Axon diversity of lamina I local-circuit neurons in the lumbar spinal.
J. Comp. Neurol. 521 (12), 2719-2741, 2013.
IF:3.508





További Közlemények

3. Antal, Z., Szűcs, P., Antal, M.: Lamotrigine effectively blocks synaptic transmission between nociceptive primary afferents and secondary sensory neurons in the rat superficial spinal dorsal horn.

Interv. Med. Applied. Sci. 3 (1), 22-26, 2011.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/IMAS.3.2011.1.5>

4. Papachatzaki, M.M., Antal, Z., Terzi, D., Szűcs, P., Zachariou, V., Antal, M.: RGS9-2 modulates nociceptive behaviour and opioid-mediated synaptic transmission in the spinal dorsal horn. *Neurosci. Lett.* 501 (1), 31-34, 2011.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2011.06.033>

IF:2.105

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 10,18

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 8,075

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

Debrecen, 2015.04.16.

