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

Dr. Szűcs Péter

Témavezető: Prof. Dr. Antal Miklós

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

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK	3
1. BEVEZETÉS	4
Célkitűzések	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	
2.1. Emlős tachykininek és bioszintézisük	6
2.2. Emlős tachykininek előfordulása a szervezetben	7
2.3. A SP mint neurotranszmitter	10
2.4. Emlős tachykinin receptorok struktúrális és funkcionális jellemzői	11
2.5. NK1 receptorok a központi idegrendszerben	12
2.6. NK1 receptorok a gerincvelőben	14
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	
3.1. Preparátumok	18
3.2. Immunhisztokémiai és morfológiai kiértékelés	19
3.3. Elektrofiziológiai mérések, farmakológia és adatanalízis	21
4. EREDMÉNYEK	
4.1. Hátsó gyöki ganglionsejtek SP érzékenysége	25
4.2. NK1 receptor eloszlása fiatal patkány gerincvelőben	29
4.3. Az V-VI-os lamina és intermedier szürkeállomány neuronjainak	
fiziológiai és morfológiai vizsgálata	33
4.4. Intermedier szürkeállomány neuronjaira érkező szinaptikus	
bemenetek SP modulációja	41
5. MEGBESZÉLÉS	
5.1. Hátsó gyöki ganglionsejtek SP érzékenysége	45
5.2. NK1 receptor immunoreaktivitás fiatal patkányok lumbális	
gerincvelőjében	46
5.3. Az intermedier szürkeállományban és az V-VI-os laminában	
található neuronok fiziológiai és morfológiai karakterizálása	47
5.4. Intermedier szürkeállománybeli neuronok SP érzékenysége	49
6. ÖSSZEFOGLALÁS	52
7. IRODALOMJEGYZĖK	54
8. KOSZONETNYILVÁNÍTÁS	72
9. FUGGELEK	73

RÖVIDÍTÉSEK

ABC	avidin-biotyn complex
AHP	utóhyperpolarizáció (afterhyperpolarisation)
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole proprionic acid
AP	akciós potenciál
DAB	diamino benzidin
DIC	differencia interferencia contrast
DRG	dorsal root ganglion
EPSP	excitatórikus posztszinaptikus potenciál
HPLC	high pressure liquid chromatography
ISI	inter-stimulus intervallum
NGS	normal goat serum
NK	neurokinin
NMDA	N-methyl-D-aszpartát
PB	phosphate buffer
РКС	protein kináz-C
PTX	pertussistoxin
SK	substance K
SP	substance P
TB	tris buffer
TPBS	tris-phosphate buffer saline
TTX	tetrodotoxin

1. BEVEZETÉS

A tachykinin családba tartozó 11 aminosavból álló substance P (SP) fontos szerepet tölt be a fájdalom információ gerincvelői szintű feldolgozásában (Maggi et al, 1993, Otsuka and Yoshioka, 1993). Az Aδ- és C- típusú primér afferensek pl. perifériás fájdalomingerre bekövetkező aktivációjakor azok centrális terminálisaiból SP szabadul fel (Jessell és mtsai., 1979, Barbut és mtsai., 1981, McCarthy and Lawson 1989). A felszabaduló SP a gerincvelő hátsó szarvában aktiválja az itt található neuronokat, az elsősorban az I-es, III-a és IV-es Rexed féle laminákban expresszált specifikus neurokinin (NK) receptoron keresztül. Krónikus fájdalom (pl. gyulladás) esetén a nagy mennyiségben felszabaduló SP ezen sejtek tartós aktivációjával hozza létre az ún. centrális szenzitizáció jelenségét. Az NK receptoroknak a mai napig három fajtája ismert, ezek közül a SP legnagyobb affinitással a G-protein kapcsolt NK1 receptorhoz (Yokota és mtsai., 1989) kötödik. Az NK1 receptorok aktiválása a másodlagos érző neuronokon hosszantartó depolarizációt eredményez (Urbán és Randic, 1984).

A gerincvelői neuronok mellett a SP közvetlenül képes aktiválni a primér afferensek egy részét is, amint azt felnőtt patkányok (Dray és Pinnock, 1982) és tengerimalacok (Spiegelman és Puil, 1990) hátsó gyöki ganglionsejtjein (DRG) végzett kísérletek igazolták.

Az NK1 receptorok és a SP eloszlását, az őket expresszáló, illetve tartalmazó neuronok morfológiáját kiterjedten vizsgálták felnőtt állatok gerincvelőjében, ugyanakkor viszonylag kevés adat áll rendelkezésünkre arra vonatkozólag, hogy fiatal állatok idegrendszerének e területein milyen ezen receptor és ligandjának megoszlása. A kérdés vizsgálatát megkönnyíti, hogy az elmúlt 2 évtizedben a neurobiológiai kutatásokban egyre nagyobb teret nyertek a különböző elektrofiziológiai módszerek, köztük a vizualizált túlélő agyszelet preparátumon végzett kísérletek. A szeletpreparátumok készítéséhez főleg fiatal állatok használhatók fel, mivel az idősebb állatokban, a fejlődés során, az egyre előrehaladottabb myelinizáció miatt a szokásos DIC optikával történő vizsgálat, és maga a preparátum készítése is nehezebbé válik.

Célkitűzéseink a következők voltak:

- Fiziológiai, morfológiai és farmakológiai módszerekkel tanulmányozni kívántuk fiatal patkányok hátsó gyöki ganglion sejtjeinek NK1 receptor expresszióját és a receptorok aktiválhatóságát SP-vel. Meg kivántuk határozni, hogy reagálnak-e a DRG sejtek SP hatására és azt, hogy vannak-e eltérések a különböző DRG sejtpopulációk SP-re adott válaszában.
- 2. Immunhisztokémiai módszerek alkalmazásával meg kívántuk vizsgálni, hogy fiatal patkányok lumbális gerincvelőszakaszán milyen módon helyezkednek el az NK1 receptorok, mennyiben egyezik meg ez a mintázat a felnőtt állatokban leírtakkal, azaz a fiatal állatokon végzett kísérletek eredményei mennyire illeszkednek be a felnőtt állatokon kapott adatok közé?
- 3. Korábbi irodalmi adatok (Brown és mtsai., 1995) és az NK1 receptor immunreaktivitás eloszlásának vizsgálatát célzó saját kisérleteink egyaránt arra utaltak, hogy a mélyebb laminák, így köztük az intermedier szürkeállomány bizonyos sejtjei sejttestjeiken NK1 receptort expresszálnak. Ezek a sejtek közvetlenül nem vesznek részt a fájdalominformáció feldolgozásában, ugyanakkor lokális posztszinaptikus célsejtjei lehetnek a nociceptív ingerfeldolgozás elsővonalbeli sejtjeinek. Célszerűnek látszott ezért az ezen a területeken elhelyezkedő sejtek kombinált morfológiai és fiziológiai módszerekkel történő vizsgálata, hogy további adatokat gyűjtsünk a lokális interneuronhálózatokat felépítő idegsejtek összeköttetéseiről.
- 4. Meg kívántuk vizsgálni, hogy van-e direkt vagy indirekt hatása a SP-nek a mélyebb gerincvelői laminákban, az irodalom által már korábban leírt és a mi kisérleteinkben is igazolt NK1 receptorokon, illetve azt, hogy befolyásolja-e a SP a fájdalominformáció feldolgozásában közvetlenül részt nem vevő sejteket is?

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A tachykinin SP 1931-ben történt első, von Euler és Gaddum nevéhez fűződő leírása, majd neurotranszmitter funkciójának 1953-ban Lembeck általi felismerése után 1970-ig, a peptid izolálásáig (Chang és Leeman, 1970; Chang és mtsai., 1971) nem sok, a peptid funkciójának megismerését célzó előrelépés történt. Az 1970 óta eltelt idő alatt virágzásnak indult a tachykininek kutatása, aminek eredményeként emlősökben 1983-ban izolálták a Neurokinin-A-t, majd a Neurokinin-B-t, ugyanakkor azonosítottak három tachykinin receptor altípust (NK1, NK2 és NK3). Megállapították, hogy a tachykinineknek számos fontos szerep tulajdonítható mind fiziológiás mind pathológiás folyamatokban. Neuroprotektív és neurodegeneratív folyamatokban betöltött szerepük ugyancsak vizsgálatok tárgyát képezi.

2.1. Emlős tachykininek és bioszintézisük

Napjainkig emlős szövetből három tachykinint izoláltak: a SP-t (Chang és Leeman, 1970; Chang és mtsai., 1971) szarvasmarha hypothalamusból, az NKA-t (neuromendin L, neurokinin, susbtance k; Kimura és mtsai., 1983) és az NKB-t (neurokinin és neuromendin k; Kangawa és mtsai., 1983), utóbbi két peptidet disznó gerincvelőből. A NKA-nak létezik két hosszabb aminosavszekvenciájú formája, a neuropeptid K (Tatemoto és mtsai., 1985) és a neuropeptid-γ (Kage és mtsai., 1988).

Az emlős tachykininek két preprotachykinin (PPT) gén termékei. A PPT-A gén a SP, NKA, neuropeptid K és a neuropeptid-γ szekvenciáját kódolja, míg a PPT-B gén az NKB kódolásáért felelős (Nawa és mtsai., 1983; Kotani és mtsai., 1986; Bonner és mtsai., 1987; Krause és mtsai., 1987).

A tachykininek prekurzorokból történő felszabadulásáért specifikus proteázok felelősek. A hasítás tipikus pontjai a Lys-Arg, Arg-Arg és Arg-Lys aminosavpárok, a hasítást pedig konvertázoknak nevezett proteolitikus enzimek végzik, amelyek 6 különböző csoportba sorolhatóak (Chertien és mtsai., 1989; Steiner és mtsai., 1992; Seidah és mtsai., 1993).

Hasonlóan az ismert neurotranszmitterekhez, a tachykininek is kálciumdependens mechanizmussal szabadulnak fel az idegvégződésekből, válaszul a megfelelő fiziológiás, vagy mesterséges ingerlésre (elektromos ingerlés, kálium-

6

illetve capsaicin-indukált depolarizáció; Maggi és mtsai., 1993). A tachykinin felszabadulással kapcsolatban két dolog tűnik bizonyosnak. Egyrészt a neuropeptidek, amik "lassú" transzmittereknek illetve neuromodulátoroknak számítanak, lassan és kis mennyiségben szabadulnak fel. Másrészt napjainkra általánosan elfogadott tény, hogy a neuropeptidek, különösen az agyban és a vegetatív idegrendszerben, nem önállóan, hanem más neurotranszmitterekkel együtt szabadulnak fel (Hokfelt és mtsai., 1986).

Miután felszabadultak, a tachykinineket számos proteolitikus enzim inaktiválja, melyeknek a különböző tachykininekkel szemben eltérő az affinitásuk. A legsérülékenyebb közülük a SP, amelynek proteolitikus hasításában három enzim játszik fő szerepet: dipeptidyl-amino peptidáz, posztprolil endopeptidáz és a cathepszin D (Regoli és mtsai., 1994).

2.2. Emlős tachykininek előfordulása a szervezetben

Amellett, hogy a tachykininek igen kiterjedten vannak jelen a centrális és perifériás idegrendszeri struktúrákban, ahol neurotranszmitter és neuromodulátor funkciót töltenek be, megtalálhatók nem neuronális szövetekben is ahol funkciójuk inkább autokrin-, parakrin- és endokrin szabályozás.

2.2.1. Nem-neuronális lokalizáció

Nem neuronális eredetű emlős szövetek közül a SP megtalálható (szerotoninnal együtt) a chromaffin sejtek egyik populációjában. Emlősök plazmájában ugyancsak kimutattak SP-t. Elképzelhető, hogy ez a SP elsősorban a bél mucosájának SP tartalmú sejtjeiből származik. Ennek a feltételezések alapja az a megfigyelés, hogy macskák intestinális ereinek lekötése és a bél eltávolítása szignifikánsan lecsökkentette a plazma SP szintjét (Gamse és mtsai., 1978) valamint az a tény, hogy a portális vér hozzávetőlegesen 4-szer több SP-t tartalmaz mint a perifériás vér (Pernow, 1983).

Carcionid tumorok tanulmányozása során nyert eredmények arra utalnak, hogy a béltraktus és egyéb szervek tumorainak epithél- és más nem neuronális eredetű sejtjei képesek expresszálni és tárolni mind SP-t, mind más tachykinineket, például NKA-t és módosult változatát, a neuropeptid-K-t (Creutzfeldt, 1996; Bishop és mtsai., 1989; Gamse és mtsai., 1981).

2.2.2. Neuronális lokalizáció

A tachykininek legjelentősebb előfordulási helye emlősőkben az idegszövet. A tachykininek elhelyezkedéséről a központi- és perifériás idegrendszerben HPLC, radioimmunoassay és immunhisztokémiai módszerek kombinálásával nyertek adatokat (Hokfelt és mtsai., 1975; Pernow, 1983; Maggio, 1985).

Az immunhisztokémiai vizsgálatokban leggyakrabban használt antiszérumok a tachykininek C-terminális régiója ellen voltak termeltetve, ami nem volt szerencsés körülmény a különböző tachykininek megkülönböztetésekor (Maggio, 1988). Jó néhány antiszérum alacsony specificitása és az eltérő szövet extrakciós eljárások (Lindefors és mtsai., 1985; Brodin és mtsai., 1986) szolgálhatnak magyarázatul arra a számos ellentmondásra, ami az irodalomban a tachykininek emlősőkbeni lokalizációjával kapcsolatban megtalálható.

2.2.2.1. Központi idegrendszer

A tachykininek központi idegrendszerben való eloszlását legrészletesebben patkányon tanulmányozták (pl. Otsuka és Yoshioka, 1993). A SP általában NKA-val együtt szintetizálódik, tárolódik és szekretálódik. A SP immunoreaktivitás emlős központi idegrendszerben az alábbi helyeken a leggyakoribb: amygdala, nucelus caudatus, globus pallidus, septum, hypothalamus, substantia nigra, periaqueductális szürkeállomány (PAG), locus caeruleus, gerincvelő hátsó és mellső szarv (Kanazawa és Jessel, 1976; Douglas és mtsai., 1982).

Patkányokban a SP denzitás és a SP tartalmú neuronok eloszlása a születéskörüli és a születés utáni periódusban intenzíven változik. A SP pozitív sejtek és rostok száma a maximumát az 5. és 15. posztnatális nap között éri el, ezután csökkeni kezd (Inagaki és mtsai., 1982; Sakanaka és mtsai., 1982).

Az emberi agyban leggazdagabb SP immunoreaktivitást mutató területek: amygdala, nucleus caudatus, putamen, globus pallidus, hypothalamus, substantia nigra, locus caeruleus (Gale és mtsai., 1978; Emson és mtsai., 1980; Cooper és mtsai., 1981).

2.2.2.2. Bélrendszer

A bélrendszerben található neuronális eredetű tachykininek előfordulási helyei a következők: a plexus myentericus és submucosus intrinsic neuronjai (Holzer és Holzer-Petsche, 1997a, 1997b) valamint az itt végződő primér afferens rostok. Ez utóbbi rostok DRG neuronokból származnak és vegetatív idegek közvetítésével jutnak el a perifériára.

2.2.2.3. Légzőtraktus, erek, bőr, immunrendszer

A tracheában és a bronchusokban található simaizomrétegben és a ganglionsejtek körül SP immunoreaktív rostokat mutattak ki. Míg a bronchusfában jelenlevő rostok kizárólag vagus eredetűek, addig a tüdő parenchymában megtalálható rostok részben vagus, részben thoracalis gerincvelői eredetűek (Manzini és mtsai., 1989).

SP pozitív idegrostokat írtak le különböző erek (pl. macska agyi erek) adventitiájában és médiájában (Liu Chen és mtsai., 1986).

Capsaicin kezelés hatására a hugyhólyag falából teljesen eltűnik a SP pozitivitás, ami arra utal, hogy az itt található SP nagyrészt szenzoros rostokban heyezkedik el (Maggi és Meli, 1988).

Emberi ujjbegy dermális papilláinak szabad idegvégződéseiben SP immunoreaktivitás figyelhető meg (Bjorklund és mtsai., 1986). Capsaicin kezelés hatására patkány bőr különböző területein mintegy 70%-al csökkent a SP immunoreaktivitás, ami arra utal, hogy a SP főleg C-típusú primér afferensekben van jelen (Holzer, 1991).

Tachykinint tartalmazó capsaicin-szenzitív primér afferensek nyirokszervekben (thymus, lép, nyirokcsomó, tüdő és bél nyirokaggregátumai) is megtalálhatók. Eloszlásuk itt jellegzetesen perivaszkuláris, de alkalmanként a folliculusok közepébe is behatolnak.

9

2.3. A SP mint neurotranszmitter

A SP, ahogyan azt számos kísérleti eredmény alátámasztja, megfelel a neurotranszmitterekkel szemben támasztott követelméyeknek. Miután a SP szintetizálódik a kis átmérőjű ganglionsejtekben (Harmar és mtsai., 1981), azok centrális és perifériás terminálisaiba transzportálódik (Holton, 1959; Brimijoin és mtsai., 1980). Ezt támasztják alá azok a megfigyelések, hogy szinaptikus vezikulákban (Cuello és mtsai., 1977) és erek körüli idegvégződésekben (Barber és mtsai., 1979) megfigyelhető volt SP immunoreaktivitás. Perifériás idegrostok stimulációja SP immunoreaktivitás megjelenését okozta a periférián (Olgart és mtsai., 1977) és a központi idegrendszerben egyaránt (Otsuka és Konishi, 1976). Gerincvelői motoneuronokon (Otsuka és Konishi, 1976), nucleus tractus spinalis nervi trigemini másodrendű szenzoros neuronjain (Andersen és mtsai., 1978) és szimpatikus posztganglionáris neuronokon (Dun és Karczmar., 1979) az exogén SP serkentő hatását figyelték meg, ami szintén a neurotranszisszióban betöltött szerepre utal.

2.3.1. A SP hatásai a posztszinaptikus membránon

Gerincvelői és agytörzsi neuronok sejttenyészeteiben SP perfúzió fokozza a sejtek ingerelhetőségét azáltal, hogy csökkenti a membrán K⁺ konduktanciáját (Nowak és Macdonald, 1982; Stansfield és mtsai., 1985). A SP K⁺ konduktanciára kifejtett hatásában valószínűleg egy PTX rezisztens G proteinnek is szerepe lehet (Nakajima és mtsai., 1988). A ganglia mesenterica inferiores neuronjaiban a K⁺ konduktancia csökkenéshez egy SP által okozott Na⁺ konduktancia emelkedés is társul (Minota és mtsai., 1981). Gerincvelő hátsó szarvi neuronokban a SP egy olyan inward áramot indukál, amelyik Ca²⁺ csatorna blokkolókkal, pl. Co²⁺-tal szelektíven blokkolható (Murase és mtsai., 1986; Murase és mtsai., 1989). A SP ugyanakkor a Ca²⁺ influxtól függetlenül is képes megemelni az intracelluláris Ca²⁺ koncentrációt, oly módon, hogy Ca²⁺-ot szabadít fel az intracelluláris raktárakból (Womack és mtsai., 1988).

2.3.2. A SP hatása szenzoros neuronokon

Intracelluláris elvezetéseket végezve ganglion trigeminale szeletek neuronjain azt tapasztalták, hogy a vizsgált neuronok közel 75%-a depolarizációval válaszolt SP (néhány mikromol) adására (Spiegelman és Puil, 1990). A ganglion trigeminale neuronok SP-re adott, TTX-inszenzitív válaszai a membrán bemeneti ellenállásának csökkenésével hozhatók összefüggésbe. Emögött valószínűleg Na⁺ és Mg²⁺ influx állhat, mivel az ezen ionoktól mentes mediumokban a SP kiváltotta válasz szinte teljesen hiányzott. A megemelkedett inward konduktanciák mellé egy egyidejű K⁺ konduktancia csökkenés is társul. Ezen adatok alapján Spiegelman és Puil (1990) a SP kiváltotta ganglion trigeminale neuron serkentés mechanizmusára a következő elképzelést dolgozták ki: a SP receptorok aktivációja egy nem-szelektív kation konduktanciát indukál, ami az íly módon megnövekedett intracelluláris Mg²⁺ koncentráció révén a K⁺ konduktancia gátlását eredményezi. A SP indukálta depolarizációhoz a feltételezés szerint hozzájárul továbbá a Cl⁻ kiáramlása is, egy eddig nem tisztázott mechanizmus révén.

2.4. Emlős tachykinin receptorok strukturális és funkcionális jellemzői

Farmakológiai és ligandkötési kisérletek eredményei alapján úgy tűnik, hogy legalább három jól elkülöníthető tachykinin receptor létezik, amelyek tachykinin peptid affinitása egymástól eltérő (Quirion, 1985; Buck és Burcher, 1986). Ily módon az eltérő tachykininek és a többféle tachykinin receptor interakcióinak variációi alakítják ki az emlős tachykininek nagymértékű funkcionális diverzitását.

Mindhárom tachykinin receptorban 7, nagymértékben konzervatív (Shigemoto és mtsai., 1990; Nakanishi és mtsai., 1990) transzmembrán domain található és tartalmaznak egy, a G-protein kapcsolt receptorokkal közös szekvenciát is (O'Dowd és mtsai., 1989; Bonner, 1989), mely sajátosságok a klasszikus kismolekulájú neurotranszmitter receptorokhoz (acetylcholin, catecholamin) teszik hasonlatossá a tachykinin receptorokat. A 7 transzmembrán domain és az ezekhez kapcsolódó citoplazmatikus rész szekvenciája 54-66%-ban megegyezik a muszkarinerg és adrenerg receptorok hasonló szakaszaival (Shigemoto és mtsai., 1990).

A harmadik citoplazmatikus hurokban és az ugyancsak citoplazmatikus Cterminális szakaszban található szerin és threonin oldalláncok száma és eloszlása eltérő a 3 receptorban. Irodalmi adatok alapján valószínűnek látszik, hogy ez az eltérés és az ebből adódó eltérő foszforiláció felelős a különböző tachykinin receptorok mértékében és sebességében eltérő formájú deszenzitizációjáért. A legnagyobb mértékű deszenzitizáció a SP receptornál (NK1), míg a legkisebb mértékű a substance K (NK3) receptornál figyelhető meg (Harada és mtsai., 1987; Shigemoto és mtsai., 1990).

A három tachykinin receptor másodlagos hírvivő rendszere hasonló; mindegyik az inozitol-trifoszfát produkciójának fokozásával emeli az cytoplazmatikus Ca²⁺ szintet (Nakanishi és mtsai., 1990).

Ligand-affinitásukban azonban eltérőek a receptorok. Míg az NK1 receptor legnagyobb affinitással a SP-t köti (SP>SK>neuromendin K), addig az NK2 receptor az NK-t (neuromendin K>SK>SP), az NK3 receptor pedig a SK-t (SK>neuromendin K>SP) (Nakanishi, 1991).

A receptorok előfordulása a perifériás és az idegszövetben nem egyforma. Az NK1 és NK2 receptor egyaránt megtalálható a periférián és a központi idegrendszerben, az NK3 receptort viszont –annak ellenére, hogy az idegrendszerben SK immunoreaktivitás kimutatható (Nawa és mtsai., 1984; Kawaguchi és mtsai., 1986)- csak a perifériás szövetekben sikerült kimutatni (Sasai és Nakanishi, 1989).

2.5. NK1 receptorok a központi idegrendszerben

Autoradiográfiával (Wolf és mtsai., 1985) és immunhisztokémiai vizsgálatokkal (Nakaya és mtsai., 1994) számottevő NK1 receptor pozitivitást mutattak ki az idegrendszer számos területén: striatum, nucleus accumbens, hippocampus, habenula, nucleus tractus solitarii, raphe magvak, medulla oblongata (Otsuka és Yoshioka, 1993). Ez a mintázat a különböző életkorú állatokban eltérő lehet, hiszen az NK1 receptort kódoló mRNS expressziója a posztnatális fejlődés során számottevően változik (Taoka és mtsai., 1996).

Az immunhisztokémiai vizsgálatokkal kapott SP és NK1 receptor eloszlás között nincs tökéletes átfedés: vannak területek, ahol a SP immunoreaktivitás ellenére NK1 receptor nem, vagy alig mutatható ki (pl. substantia nigra pars reticulata) és akadnak olyan részek, ahol a jelenlévő NK1 receptorok környékén nem mutatható ki SP innerváció (pl. a gyrus dentatus hilusa). A látszólagos ellentmondás azonban

könnyen feloldható, ha figyelembe vesszük, hogy az egyes tachykinin receptorok -bár kisebb affinitással- de aktiválhatók más tachykininek által is.

2.5.1. Az NK1 receptor szerepe összetett idegrendszeri működésekben

Az NK1 receptor agonistákkal és antagonistákkal végzett kísérletek során a kutatók bizonyos összetett viselkedési mintázatok megváltozását tapasztalták. Ezek a változások és hatások függnek a fajtól és valószínűleg különböző transzmitterek fokozott felszabadításán keresztül valósulnak meg (Eliott és mtsai., 1992). Az NK1 receptorok és a SP magasabb rendű idegrendszeri működésekben betöltött szerepét támasztja alá indirekt módon az a megfigyelés is, hogy bizonyos pszichotróp szerek megváltoztatják a tachykininek szintézisét, valamint az őket kódoló gének és az NK1 receptorok expresszióját (Sivam és mtsai., 1989).

A basalis ganglionok különösen gazdag tachykinin tartalma és tachykinin receptor expressziója felveti szerepüket a mozgásmintázatok kialakításában és a Parkinson kór pathomechanismusában (Whitty és mtsai., 1995).

A fenti megfigyeléseknek ellentmondani látszik az a tény, hogy az eddigi kísérletes adatok alapján az NK1 receptor akut blokkolása nem okoz radikális viselkedésbeni változást a kisérleti állatokban. Hasonló következtetések vonhatók le az NK1 receptor knockout egértörzzsel végzett vizsgálatokból, ahol szintén nem tapasztaltak jelentős eltérést az állatok viselkedésmintázataiban (Herrero és mtsai., 1997).

2.5.2. Neuronális degeneráció és protektív hatások

Az idegsejtek fejlődésére és túlélésére a SP trofikus hatást gyakorol in vitro (Narumi és Fujita, 1978). Ezeket a trofikus és protektív hatásokat a SP valószínűleg NK1 receptoron keresztül fejti ki és lehetséges, hogy ezek a patkány agy és gerincvelő fejlődése során is szerepet játszanak (Heath és mtsai., 1995).

2.5.3. Astrocyták NK1 receptorai

Astrocyta-tenyészetekben megfigyeltek NK1 receptor expressziót, ezeknek a receptoroknak az ingerlése foszfolipáz-C aktivációt indukált (Torrens és mtsai.,

1989), membránpotenciál változást idézett elő (Wienrich és mtsai., 1989) valamint megemelte az intracelluláris Ca²⁺ szintet (Martin és mtsai., 1992). Ezek a hatások mind funkcionális NK1 receptor jelenétére utalnak, az azonban nem ismert, hogy normál, azaz "nem stimulált" astrocyták a központi idegrendszerben, in vivo expresszálnak-e NK1 receptorokat.

2.6. NK1 receptorok a gerincvelőben

2.6.1. NK1 receptor eloszlás és plaszticitás a gerincvelőben

Immunhisztokémiai és autoradiográfiás módszerekkel az NK1 receptor jelenlétét a gerincvelő bizonyos területein (hátsó szarv, thoracalis gerincvelő intermediolaterális magja, mellső szarv bizonyos területei) korábban már kimutatták (Nakaya és mtsai., 1994). NK1 receptor agonistákkal végzett kísérletek demonstrálták, hogy míg a III-as és IV-es laminában található neuronok közel fele aktiválható volt az agonistával, addig a II-es lamina sejtjeinek csak mintegy 10% reagált valamilyen módon az NK1 receptor aktivációra (Bleazard és mtsai., 1994). Ezek alapján úgy tűnik, hogy a látszólag a II-es laminában végződő sűrű SP pozitív rostköteg tulajdonképpen áthalad a II-es laminán és azon kívűl eső neuronok sejttestjein végződik. Utóbbi feltételezést támasztják alá azok a kísérletek, amelyek során immunhisztokémiai módszerekkel demonstrálták az NK1 receptor expresszióját az I-es, III-as és IV-es laminákban, de nem találtak immunoreaktivitást a II-es laminában (Littlewood és mtsai., 1995; Polgár és mtsai., 1999). Az NK1 receptort expresszáló sejtek nagy többsége GABA és glycin negatív volt, ami azt sejteti, hogy a gerincvelőben az NK1 receptort főleg a serkentő sejtek expresszálják. Az NK1 immunopozitív neuronok egy része a tractus spinothalamicus eredő sejtjei közé tartozott az I-es, III-as és IV-es laminában (Marshall és mtsai., 1996). Ma és mtsai. (1996) megfigyelései alapján az ún. "nociceptive-specific" neuronok szignifikánsan több SP immunoreaktív rostkontaktust fogadtak, mint a fájdalominformáció feldolgozásában részt nem vevő sejtek.

Primér afferensek átvágását követően a hátsó szarv bizonyos területein NK1 receptor up-reguláció volt megfigyelhető. Ez az adat arra utal, hogy az NK1 receptort expresszáló gerincvelői sejtek egy populációját primér afferens neuronok innerválják (Croul és mtsai., 1995). Akut és krónikus gyulladásos modellekben kimutatták, hogy a

SP kötődés mennyisége kétfázisú változást mutat a gyulladás indukcióját követően. Az első 6 órában nagymértékű SP kötődés csökkenés figyelhető meg amit egy erőteljes növekedés követ az első nap végére. Ezt követően még 4-8 napig emelkedett marad a SP kötődés mennyisége (Stucky és mtsai., 1994). Immuhisztokémiai módszerekkel az NK1 receptor expressziójának emelkedését ugyancsak sikerült kimutatni számos gyulladásos modellben (Abbadie és mtsai., 1996).

Az NK1 receptor plaszticitását akut fájdalmas ingerek alkalmazásával is vizsgálták. Kimutatták, hogy a patkány talpán alkalmazott fájdalmas hőinger a SP kötődés gyors csökenését (<1 perc) idézi elő a lumbális gerincvelőben, ami valószínőleg az endogén ligand NK1 receptorhoz történő kötődésének a következménye (Yashpal és mtsai., 1994). Ezt a feltevést támasztja alá az az eredmény is, hogy fájdalmas inger azonnali NK1 receptor internalizációt vált ki a gerincvelő hátsó szarvának I-es laminájában (Mantyh és mtsai., 1995). Ezek alapán úgy tűnik, hogy a SP kötődés és az NK1 receptor expresszió kezdeti csökkenése a receptor deszenzitizációjának és/vagy internalizációjának eredménye, míg a SP kötődés és NK1 receptor expresszió elnyújtott növekedésében a receptor szintézisének és membránba kihelyeződésének aktivitásfüggő fokozódása játszik szerepet.

2.6.2. Az NK1 receptor a szinaptikus transzmisszióban - gerincvelői reflexek

Az NK1 receptor antagonista CP96345 intrathecalisan alkalmazva meggátolta mind a SP adagolásával, mind a bőrben található C típusú afferensek ingerlésével kiváltott flexor reflex facilitáló hatást, de nem befolyásolta az NKA és NMDA adagolásával kiváltott flexor reflex facilitációt (Xu és mtsai., 1992a). Azt is kimutatták, hogy a CP96345 és az MK801 (NMDA antagonista) együttes adagolása a nociceptív reflex szupra-additív gátlását eredményezte, ami arra utal, hogy az NK1 és NMDA receptorok együttműködnek a fájdalom válasz kialakításában (Xu és mtsai., 1992b).

A fent tárgyalt eredmények alapján kialakult egy elképzelés, miszerint a nemtachykinin transzmisszió felelős a nociceptív primér afferens input gyors komponenséért, míg a tachykinin input az NK1 receptorokon keresztül egy facilitáló komponenst alkot, amelynek jelentőssége megnő szövetkárosodás / gyulladás esetében. Természetesen a hátsó szarv által feldolgozott fájdalominformáció valahogy el kell hogy jusson a mellső szarvi motoros apparátushoz, hogy védekezésképpen az állat az érintett testrészt eltávolítsa a fájdalom forrásától. Számos kísérletes adat szól amellett a feltételezés mellett, hogy az NK1 receptorok szerepet játszanak a primér afferensek mechanikai, kémiai és elektromos stimulációja által kiváltott melső szarvi potenciálok kialakításában (Hosoki és mtsai., 1994; Nagy és mtsai., 1993; Nagy és mtsai., 1994). Az NK1 receptorok hozzájárulásának aránya szignifikánsan megemelkedik kísérletesen előidézett perifériás sérülést (pl. végtag UV irradiációja) követően (Thompson és mtsai., 1994).

Patkány lumbális gerincvelő motoneuronjaiból intracelluláris elvezetéseket végezve kiderült, hogy az NK1 receptorok részt vesznek hátsó gyökér-rostok stimulációjával kiváltott gyors és lassú excitatórikus posztszinaptikus potenciálok késői komponensének kialakításában (Baranauskas és mtsai., 1995). Ugyanez a kutatócsoport kimutatta, hogy az NK1 receptor antagonista SR140333 csökkentette a lumbális motoneuronokon hátsógyökér stimulációval kiváltható kumulatív depolarizáció felszálló szárának meredekségét (Baranauskas és Nistri, 1996).

2.6.3. Serkentő aminosavak és tachykininek ko-transzmissziója

A SP és a serkentő aminosavak (EAA) együttes jelenlétére a gerincvelő hátsó szarvában végződő primér afferensek terminálisaiban számos anatómiai bizonyíték szolgál (pl. Battaglia és Rustioni, 1988). A serkentő aminosavak a nociceptív transzmisszió gyors komponensének kialakításáért, míg a tachykininek ennek a transzmissziónak a lassú, elnyújtott szinaptikus eseményeken keresztül lezajló facilitációjáért felelősek.

Korai kísérletek során kimutatták, hogy a SP alkalmazása megnövelte a hátsó szarvi neuronokban a serkentő aminosavak áltak létrehozott áramokat (Randic és mtsai., 1990). Azt is demonstrálták, hogy a SP ezen modulációs hatása mind az AMPA, mind az NMDA receptorokra érvényes, és a peptid kimosását követően még hosszú ideig kimutatható. Ez felvetette annak a lehetőségét, hogy a SP ezen hatásában az NMDA receptor/ioncsatorna proteinkináz C (PKC) általi foszforilációjának lehet szerepe (Ruskin és mtsai., 1993).

2.6.4. Gerincvelői NK1 receptorok szerepe a fájdalominformáció transzmissziójában

Az első kísérletes bizonyítékot arra, hogy a SP modulátor/mediátor szereppel bír a fájdalomban, Fred Lembeck eredményei szolgáltatták, aki a gerincvelő hátsó részében nagy koncentrációjú SP-szerű anyagot talált (Lembeck, 1953). Az ezt követő kísérletek során intrathecálisan alkalmazott SP, valamint tachykinin agonisták alkalmazásával olyan viselkedési mintázatok voltak kiválthatók az állatokban (karmolás, harapás), amelyek fájdalmas ingereket követően normálisan is megfigyelhetők (Hylden és Wilcox, 1981; Piercey és mtsai., 1981).

A korai tachykinin antagonisták –egyéb hibáik mellett- neurotoxikusnak bizonyultak, így csak a nem-peptid antagonisták felfedezése után láttak napvilágot olyan adatok, amelyek az NK1 receptor anatgonisták lehetséges enyhe fájdalomcsillapító hatását valószínűsítették bizonyos hő-, mechanikai- és kémiai stimulussal kiváltott akut fájdalommodellekben. Ez a hatás azonban számszerűen igen csekélynek, sok esetben elhanyagolhatónak bizonyult (Lecci és mtsai., 1991; Yamamoto és Yaksh, 1991).

Tovább színesíti a képet az a tény, hogy néhány NK1 receptor antagonistának (pl. CP96345) viszonylag kicsi az affinitása a két leggyakrabban használt kísérleti állat, a patkány és az egér NK1 receptorához. Az is igazolt tény, hogy az ezekben a fajokban expresszált receptorokhoz nagy affinitással kötődő antagonisták (pl. RP 67580) előszeretettel kötődnek más molekuláris célpontokhoz is (pl. kálcium és nátrium csatornák), ami önmagában is eredményezhet analgetikus hatást, az NK1 receptor közreműködése nélkül.

A fent tárgyalt megfigyelések, miszerint az NK1 receptor gátlásával csak kismértékű analgetikus hatás váltható ki, arra utalnak, hogy a fájdalom információ transzmisziójában serkentő aminosavak játszanak fő szerepet, míg a tachykinin rendszer főleg moduláló hatással bír.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Preparátumok

Hátsógyöki ganglion

Az enfluránnal altatott 14 napos Wistar patkányok L4-es DRG-it ventralis feltárásból, jéghideg, 95%/5% arányú O₂/CO₂ keverékkel oxygenizált mesterséges agy-gerincvelői folyadékban (ACSF), 10-13 mm perifériás ideggel és a hozzátartozó hátsó gyökérrel együtt eltávolítottuk. Az ACSF összetétele a következő volt (mmol/l): NaCl, 130; KCl, 3,5; NaH₂PO₄, 1,25; NaHCO₃, 24; CaCl₂, 1,2; MgCl₂ 1,2, glükóz 10 (pH: 7,4). A preparátumot ezután fixálóba vagy plexiből készült elektrofiziológiai mérőkádba helyeztük, ahol szobahőmérsékleten ACSF-el áramoltattuk át.

Gerincvelő immunhisztokémiai kisérletekhez

Enfluránnal végzett mély altatásban 14 napos Wistar patkányokat transzkardiálisan perfundáltunk fiziológiás sóoldattal, majd ezt követően 4%-os paraformaldehiddel (0,1mol/l foszfát pufferben (PB; pH: 7,4). Ezután eltávolítottuk a lumbális gerincvelőt (L1-L6) és ugyanebben a fixálóban további 4 órán át fixáltuk.

Gerincvelői szeletpreparátum

A szeletpreparátumok készítéséhez újszülött és fiatal Wistar patkányokat (posztnatális 0-8 nap) használtunk. Mély isoflurán altatásban az állatokat dekapitáltuk, majd ezt követően vagy dorsalis feltárásból eltávolítottuk a lumbális gerincvelőszakaszt vagy pedig a sacrum felett ejtett bemetszésen keresztül a gerinccsatornába illesztett fecskendővel kifújtuk a teljes gerincvelőt. A preparálás minden lépése jéghideg, 95%/5% O₂/CO₂ gázkeverékkel folyamatosan átáramoltatott ACSFben (pH: 7,4) zajlott, melynek összetétele a következő volt (mmol/l): NaCl, 130; NaHCO₃, 24; KCl, 3,5; NaH₂PO₄, 1,25; CaCl₂, 1; MgSO₄, 3; glükóz, 10. Az esetlegesen a gerincvelőn maradt burkok eltávolítása után az L4-5-ös szegmentumokat kimetszettük, agarba ágyaztuk és Vibratome segítségével 3-400

mikrométer vastag szeleteket készítettünk belőlük. A szeleteket ezután 1 óráig szobahőn inkubáltuk oxigenizált ACSF-ben.

3.2. Immunhisztokémia és morfológiai kiértékelés

NK1 receptor - DRG

A paraformaldehid fixálást (4% paraformaldehid 0,1mol/l PB-ben, pH: 7,4) követően a DRG-kat 0,1mol/l PB-ben többször átmostuk, majd 0,1mol/l PB ben oldott 20%-os szacharózban tartottuk, amíg a DRG-k le nem süllyedtek. Fagyasztó mikortómmal 50 mikrométer vastag szeleteket készítettünk amelyeket 0,1mol/l PBvel mostunk. Ezt követően a metszeteket 50%-os alkohollal tártuk fel 45 percig, amit újra 0,1mol/l PB-vel való mosás követett. Az endogén peroxidáz aktivitás csökkentését 0,01% H₂O₂-dal végzetünk, melyet többszörös 0,01mol/l Tris-foszfát-fiziológiás pufferben (TPBS, pH:7,4) való mosás követett. A blokkolást 50 percen keresztül végeztük 1%-os normál kecske szérummal (NGS, Vector). Ezután metszeteinket 72 órán át inkubáltuk poliklonális, nyúlban termelt anti-NK1 receptor antitesttel (#11886-5, Dr. S. Vigna ajándéka, 1:40000). Az antiszérum specificitását korábban alaposan tanulmányozták (Vigna és mtsai., 1994). A metszeteket ezután 3 órán keresztül biotinilált nyúl ellenes kecske szérumban (biot-GAR, Vector, 1:200) inkubáltuk, amit 1 órás avidin-biotin peroxidáz komplexben történő kezelés követett (ABC, Vector, 1:100). Az egyes antitestekkel történő kezelések között a metszeteket 0,01mol/l TPBS+1% NGS oldattal többször átmostuk. Az inkubálás ideje alatt a metszeteket folyamatosan gyengéd rázásnak tettük ki, hogy biztosítsuk az oldatokkal való minél jobb és egyenletesebb érintkezésüket. Minden inkubálás szobahőmérsékleten történt. Az immunreakciót nikkel intenzifikált diamino-benzidin kromogén reakcióval tettük láthatóvá (0,05%-s DAB és 0,01%-os H₂O₂ 0,05mol/l Tris pufferben, pH: 7,4). A metszeteket ezután zselatinos tárgylemezre szedtük fel és levegőn megszárítottuk. Száradás után a metszeteket krezil ibolyával halványan háttérfestettük, vízetlenítettük és szintetikus lefedő anyaggal (DPX, Fluka, Buchs, Svájc) fedtük.

A kontroll kísérletekben a primér antitestet 1%-os NGS-el helyetesítettük. Ezekben a metszetekben specifikus jelölődést nem kaptunk. A jelölődött sejteket camera lucida segítségével tanulmányoztuk. Véletlenszerűen választott 3 állat ganglionjának 5-5 véletlenszerűen kiválasztott metszetén kirajzoltuk és megszámoltuk az NK1 receptor elleni antitesttel jelölődött, és nem jelölődött neuronokat. A kirajzolt sejtek legnagyobb átmérőjét ezután a NeuroBuild számítógépes szoftverrel mértük meg.

NK1 receptor – gerincvelő

A gerincvelő esetében az L4-es szakasz kimetszése után hasonlóan jártunk el, mint a DRG esetében. Az immunopozitív neuronok karakterizálása egy 40x-es objektívvel felszerelt Leica mikroszkóppal történt. Az immunopozitív perikaryonok eloszlásának tanulmányozásához a jelölt sejteket állatonként három véletlenszerűen választott metszetből camera lucida segítségével kirajzoltuk. Az immunopozitív sejtek arányának számszerű meghatározásához 14 napos patkány gerincvelő Nissl-festett harántmetszetből származó sejtszámot használtunk.

Biocytin - gerincvelő szelet

A gerincvelői szeletpreparátumból történő regisztrálás után a szeleteket két szűrőpapír korong (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) közé helyeztük, hogy megakadályozzuk a szelet deformálódását és gyűrődését. Ezután az íly módon kialakított "szendvicset" jéghideg fixálóba (4% paraformaldehid, 1,25% glutáraldehid és 0,2% pikrinsav 0.1mol/l PB-ben) raktuk 1-4 napra, majd a szeletekből 60 mikrométer vastag metszeteket készítettünk Vibratome segítségével. Az elektrofiziológiai regisztrálás során a regisztráló elkektródában található és a vizsgált neuronba diffundáló biocytin kimutatásához a metszeteinket avidin-biotin tormaperoxidáz módszerrel kezeltük (Extravidin, 1:1000, Vector, Burlingame, CA, USA) és a hisztokémiai reakciót DAB (Sigma, St. Louis, MO, USA) chromogén reakcióval tettük láthatóvá. A metszeteket ezt követően toluidin kékkel háttérfestettük, hogy megkönnyítsük a laminák szerinti elrendeződés megállapítását, majd dehidráltuk és DPX (Fluka, Buchs, Svájc) segítségével lefedtük őket.

A vizsgált és megtöltött neuron sejttestjét, dendritjeit és axonját ezután Neurolucida (Microbrightfield Inc., Villiston, VT, USA) segítségével három dimenzióban rekonstruáltuk az egymást követő metszetekből. A sejtek Rexed laminák szerinti elhelyezkedésének meghatározásakor egy, a fiatal patkány gerincvelő lumbális szakaszához készített lamina beosztási sémát használtunk (Kjaerulff és mtsai., 1994). A sejttestek legnagyobb és legkisebb átmérőit a szoftver segítégével megmértük majd meghatároztuk a két érték hányadosát, ami a sejt alakjára jellemző értéket adott. A rekonstruált neuronok dendrogramját megszerkesztve meghatároztuk a fő dendritek számát és a dendrit oszláspontok számát a szómától való távolság függvényében.

3.3. Elektrofiziológiai mérések, farmakológia és adatanalízis

Extra- és intracelluláris elvezetések - DRG

Az elektrofiziológiai mérésekre használt DRG-kat egy oxigenizált ACSF-el folyamatosan átáramoltatott (1,5ml/min), szobahőmérsékletű, Sylgarddal bélelt mérőkádba tűztük. A hátsó gyökeret regisztráló, a perifériás ideget stimuláló szívó elektródába húztuk. A preparátumon a regisztráció előtt 60-90 percig ACSF-et áramoltattunk át. Az extraelluláris potenciálok erősítésére Axoclamp 2A erősítőt (Axon Instruments, Union City, CA, USA) használtunk és ennek jeleit Cyberamp (Axon Instruments, Union City, CA, USA) jelkondicionálóval erősítettük illetve szűrtük tovább. Az adatokat vonalíróval rögzítettük (Graphtec) és analizáltuk. A DRG-kon 30 másodpercig áramoltattunk át SP-t (1µmol/l, Sigma). Alapos kimosást követően egy NK1 receptor szelektív nem-peptid antagonista, az RP67580 (1µmol/l, Rhone Poulenc Rorer Inc., Franciaország) 15 percig történő perfúziója után megismételtük a SP applikációt a preparátumon.

Az intracelluláris mérésekhez a fentiekben ismertetetthez hasonló preparátumokat használtunk. Ebben az esetben a DRG-kat az elektrofiziológiai mérés előtt 60-90 percig ACSF-el áramoltattuk át és 5 percig kollagenázzal kezeltük, hogy eltávolítsuk a gangliont borító capsulát. A perifériás ideget szívóelektródába húzva a DRG sejteket egyes impulzusokkal (0-100V, 20-200µs, ST-02 stimulátor, Experimetria, Budapest) ingereltük. Az intracelluláris mérésekhez kálium-acetáttal (2mol/l) töltött boroszilikát mikroelektródákat (60-80MΩ) használtunk. A feszültségjelek erősítéséhez Axoclamp 2A (Axon Instruments, Union City, CA, USA) erősítőt alkalmaztunk. A felerősített jeleket Gould oszcilloszkóp, IBM kompatibilis PC, valamint Graphtec vonalíró segítségével jelenítettük meg és analizáltuk. A vezetési sebesség kiszámításakor a stimuláló és a regisztráló elektróda közötti távolságot a stimuláló artefaktum és az akciós potenciál kezdete között eltelt idővel osztottuk el. Csak stabil, -50mV-nál negatívabb nyugalmi membránpotenciálú neuronokon mértük a SP hatását.

Mind az extracelluláris, mind az intracelluláris mérések során legalább 15 perces szüneteket tartottunk a SP alkalmazások között. A SP-t és az RP67580-at az ACSF-ben történő feloldás előtt acet-ecetsavban (20µmol/l) oldva, -20°C-on tároltuk.

Az intracelluláris mérések eredményeit a "Whole Cell Program" nevű szoftver segítségével (Dr. Dempster, Strachlyde University, Glasgow, Egyesült Királyság) egy IBM kompatibilis számítógépen analizáltuk. A numerikus adatokat "átlag ± standard hiba" formában fejeztük ki, a feldolgozott adatok statisztikai elemzését ANOVA-val végeztük.

Teljes sejt patch clamp elvezetések - gerincvelői szelet

A gerincvelői szeleteket egy oxigenizált ACSF-el folyamatosan átáramoltatott mérőkádba helyeztük, ami egy Zeiss Axioskop FS fix tárgyasztalú mikroszkóp tárgyasztalának helyére volt erősítve. A vizsgálni kívánt sejteket egy 40x-es nagyítású vízimmerziós, DIC filterrel ellátott objektív segítségével, egy videomonitorhoz kötött infravörös tartományban érzékeny CCD kamera (Hamamatsu, Japán) biztosította vizuális kontroll mellett választottuk ki. Konvencionális teljes-sejt patch-clamp elvezetéseket végeztünk current-clamp üzemmódban, 4-7MΩ ellenállású boroszilikát kapillárisból húzott elektródákkal Axopatch 1D, Axopacth 200B illetve Axoclamp 2B (Axon Instruments, Union City, CA, USA) erősítők segítségével. Az elektródák megtöltésére használt ún. intracelluláris oldat az alábbiakat tartalmazta (mmol/l): Kglukonát, 126; KCl, 4; ATP, 4; GTP, 0,3; foszfokreatin, 10; HEPES, 10 és 0.5% biocytin (Sigma, St. Louis, MO, USA) (pH:7,2). A szeletpreparátumokban megszokott, hogy a membrán átszakítását követő néhány percben a neuron spontán tüzel. Ennek kiküszöbölésére állandó hyperpolarizáló áramot (0-100pA) injektáltunk a sejtbe, azokban az esetekben amikor erre szükség volt. Ha a -60mV körüli membránpotenciálon tartáshoz szükséges áram mennyisége a kisérlet során a megadott értékhatár fölé emelkedett, a sejtet kizártuk az adatelemzésből. A sejtek ún. tüzelési mintázatát 800ms hosszú, egyre növekvő (-30pA-100pA) amplitúdójú áramimpulzusok alkalmazásával határoztuk meg. A neuronok kapacitását és soros ellenállását nem kompenzáltuk. Az elvezetések szobahőmérsékleten történtek.

A neuronok SP érzékenységének vizsgálata során alkalmazott minden farmakológiai ágenst az átáramoltatott ACSF-hez adtuk hozzá, amit vagy egy perisztaltikus pumpa, vagy pedig gravitációs perfúziós rendszer segítségével juttattuk a mérőkádba (1,5-2 ml/min). A kíssérletek során felhasznált drogok a következők voltak: SP (Sigma), SR140333 (Sanofi) szelektív NK1 receptor antagonista (Oury-Donat és mtsai., 1994), [Sar9,Met(O₂)11]-SP (Sigma) szelektív NK1 receptor agonista, TTX (Sigma). A SP ismételt alkalmazásai illetve az agonistával és antagonistával végzett kisérletek esetében az applikációk közé 7-10 perces mosásokat iktattunk be.

Az adatokat 5kHz-en szűrve egy Digidata 1320 A/D átalakító és a pClamp 8.0 szoftver (Axon Instruments, Union City, CA, USA) segítségével digitalizáltuk IBM kompaitibilis PC-n. Az adatokat ezután a Clampfit 8.0, Origin (Microcal Software, Northampton, MA, USA), Whole Cell Program valamint az Electrophysiology Data Recorder (Dr. J. Dempster, University of Strachlyde, Glasgow, Egyesült Királyság) szoftverek segítségével analizáltuk. A küszöbfeletti depolarizációt okozó áramimpulzussal kiváltott tüzelési mintázaatokból az alábbi paramétereket határoztuk meg: akciós potenciál (AP) frekvencia, AP-ok közötti időintervallum (interspike intrervals = ISI), az első és utolsó AP amplitúdója közötti arány.

A membrán időállandójának meghatározásához (τ) a sejten kis amplitúdójú negatív áramimpulzussal (-10pA, 800ms) kiváltott feszültségváltozás kezdeti szakaszára illesztettünk exponenciális függvényt. Az áram-feszültség (I-V) görbék ábrázolásakor a küszöbalatti áramimpulzusok amplitúdójának függvényében tüntettük fel a neuronon kialakuló feszültségváltozás amplitúdóját. Az AP-k és utóhyperpolarizációk (afterhyperpolarization = AHP) amplitúdóját az AP küszöbértékétől mértük. Az AP félszélesség értékének meghatározásához a küszöbtől számított AP amplitúdó felét használtuk. Az AP küszöbértékének, az AHP amplitúdójának valamint alakjának vizsgálatához a legalacsonyabb, már AP-t kiváltó áramimpulzus során regisztrált feszültségváltozás-görbét használtuk (Ruscheweyh és Sandkühler, 2002).

A SP modulációs hatását célzó kisérletek során a neuronokból elvezetett spontán excitatórikus posztszinaptikus potenciálokat (EPSP) a regisztrátumokból

utólag "off-line" detektáltuk majd meghatároztuk az így kiszűrt és a felszálló szakasz kezdeti pontjára igazított EPSP-k amplitúdóját, időtartamát, valamint meredekségét. Ugyancsak meghatároztuk az EPSP-k frekvenciáját és az inter-EPSP intervallumokat, azaz a két egymást követő EPSP között eltelt időket.

A görbék illesztését a Clampfit 8.0 szoftver (Axon Instruments, Union City, CA, USA) beépített, iteratív Levenberg-Marquadt algoritmusának segítségével végeztük el. Minden numerikus adatot "átlag ± standard hiba" formában fejeztünk ki. Az adatok statisztikai analíziséhez Student féle *t*-próbát használtunk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Hátsó gyöki ganglionsejtek SP érzékenysége

4.1.1. NK1 receptor immunhisztokémia hátsó gyöki ganglionokban

A véletlenszerűen választott DRG metszetek mindegyikén, a metszetek teljes mélységében, egyenletes eloszlásban meg volt figyelhető NK1 receptor immunpozitivitás. A jelölt neuronok nem mutattak semmilyen szembeötlő elrendeződést, bár esetenként több jelölt sejt kisebb csoportokba rendeződött. Az immunopozitív sejtek általában membránjukon jelölődtek, leggyakrabban szakaszos jelleggel. Alkalmanként a sejttesten belül is megfigyelhető volt jelölés és néhány sejten a szómából kiinduló immunopozitív nyúványok is láthatóak voltak. Az epi-, peri- és endoneurium területén néhány apró ovális sejt ugyancsak immunopozitívnak tűnt. A kontroll kísérletekben nem kaptunk jelölést a metszetekben (1. ábra).

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

4.1.2. Extracelluláris elvezetések DRG sejtekből

A DRG-kon a 30 másodpercen át tartó SP (1 μ mol/l) perfúzió egy hosszantartó, elnyújtott deplarizációt váltott ki, amelynek átlagos amplitúdója 320 ± 49,7 μ V (200-600 μ V), átlag időtartama (az alapvonalhoz való visszatérésig) pedig 248 ± 9,7s (162-297s) volt (n=18). A kisérletek során az ismétlődő SP alkalmazások nem okoztak a preparátumban nyilvánvalóan megfigyelhető deszenzitizációt. Az RP 67580 (1 μ mol/l), nem-peptid NK1 receptor antagonista, a SP által kiváltott válasz amplitúdóját csak kismértékben csökkentette (3. ábra). Az antagonista magasabb koncentrációkban sem okozott nagyobb mértékű csökkenést. Az amplitúdó átlagos csökkenése 23 ± 2,5% volt (n=4).



1. ábra Neurokinin-1 (NK1) receptor immunoreaktivitás hátsó gyöki ganglion (DRG) neuronokban. (A) NK-1 receptor immunopozitív és -negatív DRG neuronokról készült kis nagyítású kép. Kalibráció: 40µm. (B) Nagy nagyítású kép egy NK-1 receptor immunopozitív DRG neuronról. Jól látható immunopozitív az unipoláris nyúlvány-kezdet (nyíl). Kalibráció: 15µm. (**C**) Kis nagyítású kép egy kontroll kísérletbôl származó DRG metszetről. A primér szérumot normál szérummal helyettesítettük. Ezekben a metszetekben NK-1 receptor immunopozitív neuron nem volt látható. Kalibráció: 100µm



2. ábra A teljes sejtpopuláció (üres oszlopok) és az NK1 receptor immunopozitív sejtek (telt oszlopok) legnagyobb átmérôjének száza-lékos megoszlása különbözô állatok 3-3 DRG metszetében. NK-1 receptor pozitív sejtek a teljes mérettartomány-skálán megtalálhatók, de a többségük a közepes mérettartományba tartozott.

4.1.3. Intracelluláris elvezetések DRG sejtekből

A SP hatásának tanulmányozásásra alkalmas stabil elvezetéseket 29 neuronból sikerült nyernünk. A DRG neuronok karakterizálására az ideg-impulzusok vezetési sebességét használtuk. A sejteket 2,6m/s feletti rostvezetési sebesség esetén A α/β -csoportba, 0,8-2,6 m/s közötti vezetési sebesség esetén az A δ -, míg 0,8 m/s alatti értékek esetében a C-típusba soroltuk (Nagy és mtsai., 1993; Fulton és mtsai., 1987). Ezen kritériumok alapján szétválasztva, 10 A α/β -, 11 A δ - és 8 C-típusú sejt SP érzékenységét vizsgáltuk. A vizsgált neuronok aktív- és passzív membránparaméterei (1. táblázat) megfeleltek az adott DRG neuron típusnak és arra jellemzőek voltak (Nagy és mtsai., 1993; Fulton és mtsai., 1987).

	Αα/β	Αδ	С
Nyugalmi membrán potenciál (mV)	$-64,4 \pm 1,38$	$-61,9 \pm 1,33$	$-60 \pm 3,16$
Intracelluláris ingerlési küszöb (nA)	$0,7 \pm 0,19$	$1,91 \pm 0,95$	$1,19 \pm 0,42$
Extracelluláris ingerlési küszöb (V*µs)	5185 ± 2067	7761 ± 1753	15210 ± 5384
Vezetési sebesség (m/s)	$4,68 \pm 0,54$	$1,93 \pm 0,1$	$0,69 \pm 0,04$
AP amplitúdó (mV)	$64,23 \pm 7,28$	$75,68 \pm 5,24$	81,43 ± 11,12
AP szélesség (ms)	$2,88 \pm 0,41$	$3,4 \pm 0,46$	$4,16 \pm 0,83$
Felszállási idő (ms)	$0,85 \pm 0,1$	$0,74 \pm 0,06$	$1,1 \pm 0,15$
n	10	11	8

1. táblázat Hátsó gyöki ganglion (DRG) neuronok membránparaméterei 14 napos patkányban

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



3. ábra A szelektív nem-peptid NK-1 receptor antagonista RP 67580 a DRG-n a SP által kiváltott válasz amplitúdóján okozott kismértékû csökkenést. Az egyes elvezetések a SP-re adott, hátsó gyökérrôl elvezetett választ mutatják (**a**) kontroll kísérletben, (**b**) RP 67580 jelenlétében, (**c**) az antagonista kimosását követően.

4. ábra SP hatása hátsó gyöki ganglion (DRG) neuronokra. A perifériás idegen keresztül kiváltott AP késési idejének és paramétereinek megállapítása után a DRGkon SP-t (1µmol/l) áramoltattunk át. A SP applikáció depolarizációt okozott 2 Aδ- és 2 C-tipusú sejtben, 2 Aδ neuron esetében pedig depolarizációt és tüzelést. (A) Egy Að-tipusú neuron válasza. A felső regisztrátumon a perifériás ideg stimulálására (30V/100µs) kialakuló AP látható. Alul a SP perfúzió közben megjelenő reverizbilis depolarizáció és AP-ok láthatók. (B) C tipusú neuronból történt elvezetés során perifériás ideg stimulálásával (50V/200µs) kiváltott AP (felső regisztrátum) és SP (1µmol/l) hatására kialakult reverzibilis depolarizáció (alul).

4.2. NK1 receptor eloszlása fiatal patkány gerincvelőben

Az NK1 receptor immunopozitivitást mutató neuronok számszerű összefoglalása a 2. táblázatban látható.

Lamina	Teljes sejtszám / 40µm metszet	Sejt tipus	NK1 receptor immunopozitív sejtek abszolút száma	NK1 receptor immunopozitív sejtek relatív száma
LI	221 ± 28	Összes	$23 \pm 2,4$	10,4%
		Multipoláris	$4,3 \pm 0,3$	18,7%
		Fusiformis	$17,5 \pm 2,3$	76,1%
		Pyramidális	$1,2 \pm 0,2$	5,2%
LII	341	Összes	$8,25 \pm 1,7$	2,4%
		Islet	$0,8 \pm 0,2$	9,7%
		Stalked	$6,7 \pm 0,9$	81,2%
		Cajal-féle "transverseoux"	$0,28 \pm 0,07$	3,4%
		Beal-féle centrális	$0,\!47\pm0,\!09$	5,7%
LIII	446	Összes	$19,7 \pm 1,8$	4,4%
		Centrális	$17,4 \pm 1,5$	88,3%
		Antenna	$2,3 \pm 0,7$	11,7%
LIV	228	Összes	$10,7 \pm 1,3$	4,7%
		Centrális	$7,2 \pm 1,3$	67,3%
		Antenna	$3,5 \pm 0,9$	32,7%

2. táblázat NK1 receptor imunopozitív sejtek abszolút és relatív száma fiatal patkány gerincvelői hátsó szarv különböző lamináiban

A legerősebb immunoreaktivitás az I-es laminában volt megfigyelhető (5. ábra). Sejttestek és rostok egyaránt intenzíven jelölődtek ezen a területen (6a, b, d, e, f. ábra). A laminára jellemzőek voltak a szürkeállomány dorsális szélével párhuzamosan futó vastag dendritek. Ebben a laminában a jelölt sejtek nagy többsége két sejttípusba tartozott. A kis kerek sejttestű neuronok (76,1%) a "fusiform" sejtek csoportjába (Lima and Coimbra, 1986), míg körülbelül 20%-a a jelölt sejteknek a hosszú, a fehér-/szürkeállomány határral párhuzamos denritekkel bíró (6a. és 6c. ábra) multipoláris sejtek csoportjába tartozott.

A II-es laminában az immunreakció nem mutatott homogén eloszlást. Míg a lamina laterális része praktikusan üres volt, addig a középső/mediális rész enyhe jelölődést mutatott (5. ábra, 6d-f.ábra). A lamina neuronjainak összességében 2-3%-a jelölődött és ezen sejtek 80%-a kis, elnyújtott sejt volt. Ezek a sejtek morfológiai jegyeik alapján (dorsalisan és ventralisan kiinduló dendritek) "stalked" sejteknek

feleltek meg (Gobel, 1978; Schoenen, 1982; Todd and Lewis, 1986; Willis and Coggeshall, 1991). A pozitív neuronok 10%-a "islet" sejtekre emlékeztető sejt volt, kicsi kerek sejttesttel amik a transzverzális síkban nem rendelkeztek dendritekkel (6f. ábra). A fentmaradó immunopozitív sejtek száma alacsony volt, de jellemzőek voltak a II-es laminára. Ezek a neuronok nagy multipoláris sejttesttel bírtak, dendritjeik általában a sejttestől messzire is követhetők voltak és az I-es, a III-as vagy a IV-es laminák felé tartottak, morfológiai jellegzetességeik miatt Cajal "transverseoux" sejtjeinek illetve Beal nagy centrális setjeinek feleltek meg (Ramón y Cajal, 1909; Beal, 1983). A III-as és IV-es lamina gazdag immunopozitív rost hálózatot tartalmazott , legsűrűbben a IV-es lamina mediális részében (5. ábra). A III-as lamina



5. ábra A lumbális 4-es (L4) szegmentumban megfigyelhető NK1 receptor immunoreaktivitás, transzverzális gerincvelői metszeten. A legerősebb immunopozitivitás az I-es laminában figyelhető meg. Kalibráció: 200µm.

sejtjeinek 4%-a, míg a IV-es lamina neuronjainak 5%-a volt immunopozitív és a jelölt sejtek két fő sejttípushoz tartoztak. A III-as lamina pozitív sejtjeinek 90%-a kerek vagy multipoláris sejtmaggal bírt és dendritjeik nem léptek be felületesebb laminákba, bár arrafelé indultak. Ezen ismérvek alapján centrális sejteknek kategorizáltuk őket (Réthelyi and Szentágothai, 1969, 1973; Brown, 1981; Maxwell, 1985). A fenmaradó 10% az immunopozitív III-as lamina beli sejtek közül antenna sejt volt, multipoláris sejttesttel és dorsális irányba húzódó, a II-es és I-es laminát mindig elérő dendritekkel (Réthelyi and Szentágothai, 1969, 1973; Brown, 1981; Maxwell, 1985).



6. ábra NK1 receptor immunoreaktív sejtek (nyílhegyek) a különboző laminákban, patkány lumbális gerincvelő transzverzális metszetén. (a,b) Multipoláris sejtek az I-es lamiában, (c) "fusiform" neuron az I-es laminában, (d) nagy centrális sejt a II-es laminában, (e) "stalked"-, (f) "islet"-, (g) és centrális neuron a II-es lamina területén. A sejttestek és a rostok egyaránt intenzíven jelölődtek és a hátsó felszínnel párhuzmosan futó vastag dendritek is jellemzőek voltak erre a területre (a, b, d-f). Antenna sejtek a IV-es laminában (h, i). Kalibráció: 50μm.

A IV-es laminában a centrális sejtek 65%-os, míg az antennasejtek 35%-os arányban képviseltették magukat a jelölt sejtek között. Az V-VII laminák immunoreaktivitása egységes és relatíve gyenge volt (5. ábra). Az V-ös laminában immunopozitív sejteket a lamina mediális és laterális részében csoprotokba rendeződve találtunk, a VI-os laminában elszórtan helyezkedett el néhány pozitív sejttest, míg a VII-es laminában a canalis centrálistól laterálisan, nagy immunopozitív sejteket tartalmazó sejtcsoportot figyeltünk meg. Ezek a pozitív sejtek általában multipolárisak voltak, a VI-es lamina mediális részén található sejtek kifejezetten nagy szómával rendelkeztek, dendritjeik pedig mediolateralisan orientációt mutattak (7a. és 7b. ábra).

A VIII-as lamina mutatta a leggyengébb immunoreaktivitást, itt alig találtunk NK1 receptor ellenes antitesttel jelölt sejttesteket (5. ábra).

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

A canalis centrális körül elhelyezkedő X-es lamina halványan jelölt neuronokat és erős immunoreaktivitást mutató rostokat tartalmazott, amelyek sűrű hálózatot formáltak a canalis centrális körül (7b-c. ábra). Az immunopozitív sejttestek kicsik, multipolárisak vagy fusiformisak voltak és zömmel a canalis centrálistól dorsálisan helyezkedtek el.



7. ábra Multipoláris immunopozítiv sejttestek (nyílhegyek) az V-VII laminákban (a, b) és a canalis ventrális körül (c). Figyelemreméltó a gazdag immunoreaktív rostelágazódás a canalis centrális körül (b, c). Kalibráció: 50µm.

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

Kisérleteink során mintegy 70 neuronból sikerült stabil fiziológiai méréseket végeznünk. Néhány szeletben egyidejűleg több sejtből is regisztráltunk, de egy szeletben háromnál több sejtet nem vezettünk el, mivel ez megnehezítette volna a későbbi morfológiai azonosítást. Az elvezetett szeletek közül 47 esetben volt az elektrofiziológiai regisztrálás mellett a biocytin jelölés is sikeres. A regisztrált sejtek átlagos membránpotenciálja -51,71 ± 1,52 mV volt. A küszöbfeletti depolarizációt okozó áramimpulzusokkal kiváltott tüzelési mintázataik alapján a neuronokat a következő négy csoportba soroltuk: (i) "phasic" sejtek (n=10); (ii) "repetitive" neuronok (n=15); (iii) "single" sejtek (n=9); és "slow" neuronok (n=8). A fentmaradó 5 neuron esetében a tüzelési mintázat egyik csoportba sem illett bele maradéktalanul, mivel ezeknél a sejteknél mind a "phasic", mind pedig a "repetitive" csoport tüzelésére jellemző tulajdonságok megfigyelhetők voltak .

4.3.1. Tüzelési mintázatok

A "phasic" neuronok a hosszantartó küszöbfeletti depolarizáló impulzusokra folyamatos AP sorozattal válaszoltak (8a. ábra). Emellett kifejezett AP amplitúdó akkomodációt mutattak, és egy markáns AP közötti időtartam megnyúlás is megfigyelhető volt a 800ms hosszú áramimpulzus időtartama alatt (8b. ábra). Az első és az utolsó AP amplitúdója közötti arány átlaga 5,56 \pm 0,72 volt, míg ez az arány az első és utolsó két AP között eltelt idők esetében (ISI) 0,44 \pm 0,03-nak bizonyult. Az AP-k után rövid monofázisos utóhiperpolarizációk (AHP) voltak megfigyelhetők.

A "phasic" sejtekhez hasonlóan, a "repetitive" neuronok is folyamatos AP sorozattal reagáltak a depolarizáló áramimpulzusra (8a. ábra). Ugyanakkor, a "phasic" csoport sejtjeivel ellentétben, sem az AP-k amplitúdójában, sem pedig frekvenciájukban nem volt akkomodáció megfigyelhető (8b. ábra). Az AP-kat ebben a csoportban mindig lassú, kifejezett monofázisos AHP követte (8c. ábra).

A többi sejttípussal ellentétben a "single" neuronok csak egy (néhány esetben maximum kettő) AP-t tüzeltek a küszöbfeletti depolarizációt eredményező négyszögimpulzus ideje alatt. (8a. ábra). További AP-ok csak a nyugalmi membránpotenciálra való visszatérérs után voltak kiválthatóak. Ezeknél a neuronknál az AP-ok után csak egy kismértékű AHP-t figyeltünk meg (8c. ábra).

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

4.3.2. Aktív és passzív membránparaméterek

Statisztikai analízis során a nyugalmi membránpotenciál, a bemeneti időállandó, az AP túllövése és félszélessége esetében nem találtunk szignifikáns eltérést a csoprotok között, habár a fent említett paraméterek közül az első kettő (nyugalmi membrán potenciál és bemeneti időállandó) a "slow" és "single" neuronok esetében alacsonyabbnak bizonyult mint a "repetitive" és "phasic" sejteknél. A legkisebb átlagos bementi időállandót a "single" csoportban mértük (26,6 ± 8,82 ms). Ezen kívül a "phasic" és "single" sejtek esetében nagyobb -bár nem szignifikánsan eltérő- AP félszélesség értékek voltak megfigyelhetők mint a másik két tüzelési mintázat csoportnál (3. táblázat). Ugyanakkor a "single" és "slow" neuronok bizonyos paraméterei elkülönítették ezt a két csoportot a többitől és egymástól is. A "single" csoport neuronjai rendelkeztek a legalacsonyabb AP amplitúdóval (54,44 ± 4,14 mV) és túllövéssel (16,84 ± 6,16 mV), ugyanakkor a legmagasabb küszöbértékkel is (-40,94 ± 5,95 mV) az összes elvezetett neuron közül. A küszöbértékek közel azonosak voltak a "repetitive" és "phasic" neuronoknál, a legalacsonyabb értékekkel a "slow" csoport sejtjeiben találkoztunk (-45,2 ± 1,47 mV). A "single" csoport esetében az AHP átlagos amplitúdója szintén a legalacsonyabb volt a vizsgált neuronok közül (3. táblázat).



8. ábra Az V-VII lamiákban regisztrált négyféle tüzelési mintázat (A oszlop). Az elvezetések az alattuk bemutatott áramimpulzusokra adott membránpotenciál változásokat ábrázolják. A B oszlopban az egymást követő AP amplitúdók arányának szemléletesebb bemutatása látható. Jól látszik, hogy a "phasic" csoport neuronjai kifejezett amplitúdó akkomodációt és az egymást követőAP-ok közötti időtartam rövidülést mutatnak. A "repetitive" és a "slow" csoport neuronjai állandó amplitúdójú AP-okkal, míg a "single" csoport sejtjei csak egyetlen egy AP-al válaszoltak a küszöbfeletti depolarizációt kiváltó áramimpulzusra. (C oszlop) Az első AP-ok kinagyított képe. A nyílhegytek az AP-t követő AHP-t mutatják.



9. ábra Az V-VII laminában regisztrált neuronok áram-feszültség görbéi. A diagram a membránpotenciál változás értékét mutatja az alkalmazott áramimpulzus amplitúdójának függvényében

Az áram-feszültség görbék vizsgálatakor kitűnt, hogy a legkevésbé meredek görbe a "slow" csoport neuronjait jellemzi, de a "single" neuronok is alacsonyabb értékekkel rendelkeztek mint a maradék két csoport sejtjei (9. ábra). Ennek megfelelően a "slow" sejteknek volt a legkisebb az átlagos bemeneti ellenállása (3. táblázat).

	PHA	REP	SLO	SIN	Szignifikancia
	(n=9)	(n=14)	(n=7)	(n=8)	(Student-féle t-próba)
Nyugalmi	$-51 \pm 4,2$	$-53,6 \pm 2,54$	$-49 \pm 2,79$	$-47 \pm 3,97$	N.Sz.
membrán-					
potenciál (mV)					
Bemeneti	$50,83 \pm 7,74$	$41,81 \pm 5,4$	$32,36 \pm 4,42$	$26,6 \pm 8,82$	N.Sz.
időállandó (ms)					
Bemeneti	994 ± 197	822 ± 151	304 ± 59	643 ± 166	PHA vs. SLO, P<0,01;
ellnállás (MΩ)					REP vs. SLO, P<0,01;
					PHA vs. SIN, P<0,05.
AD1", "1	42.0 + 2.05	427.217	45 0 + 1 47	40.04 + 5.05	NG
AP KUSZOD	$-43,8 \pm 2,03$	$-43,7 \pm 3,17$	$-45,2 \pm 1,47$	$-40,94 \pm 5,95$	IN.5Z.
(IIIV) A Damplitúdá	60 ± 1.18	65.70 ± 2.57	60.03 ± 2.3	54 44 ± 4 14	DUA ve SIN D-0.05
$(\mathbf{m}\mathbf{V})$	$09 \pm 4,40$	$03,79 \pm 2,37$	$09,03 \pm 2,3$	$54,44 \pm 4,14$	P = P = P = P = P = P = P = P = P = P =
$(\Pi \mathbf{v})$					SLO vs. SIN, $P < 0.01$
AP túllövés	25 15 + 5 28	23 97 + 3 95	2342 + 406	1684+616	N Sz
(mV)	20,10 = 0,20	20,77 = 0,70	23,12 = 1,00	10,01 = 0,10	11.02.
AP félszélesség	1.41 ± 0.17	1.08 ± 0.08	1.1 ± 0.07	1.52 ± 0.2	N.Sz.
(ms)	-,,	-,,	-,,.	-,,-	
AHP amplitúdó	$13,26 \pm 2,49$	$16,98 \pm 2,3$	$14,79 \pm 2,16$	$8,91 \pm 1,35$	REP vs. SIN, P<0,01;
1	, ,	, ,	, ,		SLO vs. SIN, P<0,05.
Átlagos tüzelési	N.É.	$21,83 \pm 1,5$	$8,9 \pm 0,6$	N.É.	REP vs. SLO,
frekvencia (Hz)					P<0,001.

3. táblázat Neuronok passzív és aktív membránparaméterei az V-VII laminákban. PHA, "phasic"; REP, "repetitive"; SLO, "slow"; SIN, "single"; AP, akciós potenciál; AHP, utóhyperpolarizáció; N.Sz., nem szignifikáns; N.É., nem értelmezhető.
4.3.3. Laminák szerinti megoszlás és morfometriai paraméterek

A 47 sikeres biocytin-jelölt és rekonstruált neuronból 13 az V-VI laminában, míg 34 a VII-es laminában, azaz az intermedier szürkeállományban volt megtalálható. A membrán paraméterekhez hasonlóan, a "phasic" és "repetitive" neuronok eloszlása és morfológiai jellemzőik hasonlóak voltak egymáshoz, viszont a "single" és "slow" sejtek csak rájuk jellemző karakterisztikus jegyeket mutattak. A legtöbb "phasic" (10ből 8) és "repetitív" (15-ből 13) neuron multipoláris sejttesttel, 4-6 törzsdendrittel rendelkezett és az V-VII laminákban egyenletesen oszlottak el (10. ábra). A kilenc "single" neuron közül 7 darab az V-VI-os lamina laterális részén volt megtalálható. Ezekben a neuronokban a kis kerek sejtetstből 3-5 törzsdendrit indult ki, amelyek hosszú, de szegényesen oszló, dorso-ventrális orientációjú dendritfát alkottak. Öt esetben az axon ugyancsak megjelölődött. Az axon -miután kilépett a sejttestbőlventrálisan haladt és a ventrális szürkeállomány területén végződött (10. ábra). A vizsgált sejtek közül a "slow" tüzelési mintázattal rendelkező neuronoknak volt a legnagyobb és legelnyújtottabb szómája. A 8-ból 6 esetben a "slow" sejtek 6-8 törzsdendrittel bírtak, amelyek két csoportba rendeződve a sejt két átellenes polusán eredtek és egy gazdagon oszló dendritfát alakítottak ki. A többi sejttel ellentétben a "slow" neuronok kizárólag a VII-es lamina ventromediális részén voltak megtalálhatóak. Hét esetben az axon szintén megjelölődött, és vagy a középvonal felé, vagy laterális irányba tartott. Az 5 mediális orintációjú axon közül 4 átlépte a középvonalat a comissura anteriorban és a contralaterális ventrális szürkeállományban végződött. A laterális irányba induló axonok a laterális motoros oszlop felé tartottak (10. ábra).



10. ábra A négy tüzelési mintázat csoportba tartozó reprezentatív neuronok mikrofotói és Neurolucida rekonstrukciói. A sejttest és a dendritek feketével, az axon szürkével van ábrázolva. A gericnvelő harántmetszeti sémákon a fekete pontok az adott csoportba tartozó neuronok elhelyezkedését mutatják. A gerincvelő szürke- és fehérállománya közti határt szaggatott-, míg a Rexed laminák közti határt folyamatos szürke vonal jelzi. D = dorsális, M = mediális. Kalibráció: 100µm.

A rekonstruált neuronok szómáinak területét, leghosszabb- és legrövidebb átmérőit vizsgálva szintén a "slow" csoport sejtjei bizonyultak eltérőnek a másik három -ezen paraméterekben egymáshoz meglehetősen hasonló- csoporthoz képest (4. táblázat), amennyiben az ebbe a csoportba tartozó sejtek rendelkeztek a legnagyobb és legelnyújtottabb szómával.

	PHA (n=10)	REP (n=15)	SLO (n=8)	SIN (n=9)	Szignifikancia (Student-féle <i>t</i> -próba)
Átlagos maximális keresztmetszeti terület (um ²)	$209 \pm 19,69$	$268,55 \pm 30,72$	$376,49 \pm 37,61$	$209,32 \pm 26,34$	PHA vs. SLO, P<0,01; REP vs. SLO, P<0,05; SIN vs. SLO, P<0,01.
maximum	$24,57 \pm 2,63$	$27,42 \pm 2,45$	35,8 ± 3,91	$21,26 \pm 1,4$	N.Sz.
átmérő (μm) Minimum átmérő (μm)	$13,38 \pm 0,77$	15,85 ± 1,09	17,47 ± 0,84	$14,08 \pm 0,79$	N.Sz.
max. / min. átmérő	$1,84 \pm 0,16$	$1,81 \pm 0,22$	$2,11 \pm 0,3$	$1,51 \pm 0,07$	N.Sz.

4. táblázat Biocytin jelölt neuronok morfometriai paraméterei az V-VII laminákban. PHA, "phasic"; REP, "repetitive"; SLO, "slow"; SIN, "single"; N.Sz., nem szignifikáns.

A dendritfa oszláspontjainak megoszlását vizsgálva kiderült, hogy a "phasic", "repetitive" és "single" csoportok neuronjainak átlagos dendritelágazódási pont hisztogramjai egymáshoz nagyon hasonlóak. Ugyanakkor ezen paraméter esetében is eltérőnek bizonyultak a "slow" csoport neuronjai. Amíg az első három csoportba tartozó sejtek dendritjei kevés számú elágazási ponttal rendelkeztek és ezek zömmel a sejttest közvetlen környezetében voltak megtalálhatóak, addig a "slow" csoport neuronjainak dendritjei gazdag elágazásrendszerrel bírtak, ami a szómátol távolabb is magasabb dendrit oszláspont számban mutatkozott meg és bokorszerű megjelenést kölcsönzött ezeknek a sejteknek (11. ábra)



11. ábra Az V-VII laminában regisztrált neuronok dendritelágazódási mintázatai. (A oszlop) Átlagos dendriteloszlási pont hisztogrammok a négy különböző tüzelési mintázatú csoportban. Az 50μm-re eső dendrit oszláspontok száma a szómától való távolság függvényében van feltüntetve. (**B és C oszlop**) A háromdimenzióban rekonstruált neuronok dendritfájának oszlási mintázata (dendrogram) és egy reprezentatív sejt Neurolucida rekonstrukciója mind a négy csoprotból. Megfigyelhető, hogy amíg a "phasic", "repetitive" és "single" csoport sejtjeinek dendritjei főleg a sejttest közelében (100-150μm) oszlanak leggyakrabban, addig a "slow" tüzelési mintázatú neuronok dendritjei a szómától távolabb is folyamatosan oszlanak. Kalibráció: 100μm.

4.4. Intermedier szürkeállomány neuronjaira érkező szinaptikus bemenetek SP modulációja

4.4.1. SP hatása a preszinaptikus bemenetekre

A SP intermedier szürkeállomány neuronjainak preszinaptikus bemeneteire gyakorolt modulációs hatásának vizsgálata során 34 neuronból sikerült stabil elvezetéseket végeznünk, és ezzel egyidőben kielégítő minőségű biocytin-töltést kapnunk. A korábbi immunhisztokémiai reakciók alapján –amelyek szomatikus NK1 receptor jelölődést mutattak- a hátsószarvi neuronokhoz és a DRG sejtekhez hasonlóan lassú depolarizációt vártunk fiziológiai válaszként a regisztrált sejtekben. Néhány esetben ez megfigyelhető volt, de a tipikus és markáns válaszreakció nem ez, hanem (11-ből 7 sejt esetében) a sejtmembánon regisztrált EPSP-k számának, kifejezett emelkedése volt (12. ábra). Az ismételt SP applikáció hasonló, de kisebb mértékű EPSP szám növekedést váltott ki. A SP által kiváltott válasz kialakulása 2-3 perccel a drog bemosásának kezdete után volt megfigyelhető (12. ábra).



12. ábra SP hatása intermedier szürkeállományi neuronok membránján regisztrált EPSP-k frekvenciájára. Az ábra felső részén az egymást követő EPSP-k között eltelt idő, míg az alsó részén az adott időegységre eső EPSP-k száma van feltüntetve az idő függvényében. Jól megfigyelhető az EPSP-k számának nagymértékű növekedése a SP (1µmol/l) applikáció során. A szürke oszlopok azokat az időszakaszokat jelzik, amikor a regisztrált neuron tüzelési mintázatát és membránparamétereit állapítottuk meg.

A megfigyelt SP hatást az SR140333 (10nmol/l) nem-petid NK1 receptor antagonista effektíven blokkolta 11-ből 7 esetben. Az antagonista jelenétében a SP EPSP-szám növekedést nem volt képes kiváltani. Az antagonista kimosását követően a SP ismételt, ekkor már önálló alkalmazása általában nem járt markáns EPSP szám növekedéssel (13. ábra). Elképzelhető, hogy az NK1 receptor deszenzitizációját ebben az esetben a nem-peptid antagonista kapcsolódása is kiváltja és ez a mechanizmus felelős a SP hatás elmaradásáért.

A [Sar9,Met(O₂)11]-SP (50-200nmol/l) potens NK1 receptor agonistával végzett kísérletek során a SP hatásához nagyon hasonló, nagymértékű EPSP-szám növekedés volt megfigyelhető mind a 9 vizsgált sejt esetében (14. ábra).

Ezek után azt akartuk megvizsgálni, hogy a megnövekedett EPSP szám hátterében a spontán szinaptikus transzmisszóból adódó EPSPk számának növekedése áll, vagyis a SP a preszinaptikus neuronok tüzelésési frekvenciáját növeli-e meg, avagy az akciós potenciál független transzmitterfelszabadulás növekszik meg és ebben az esetben az ún. mini-EPSP-k számának növekedése áll a nettó EPSP frekvencia emelkedés hátterében. A kérdés megválaszolása érdekében megismételtük a SP (1µmol/l) applikációt 500nmol/l TTX jelenlétében. A TTX bemosását követően a kezdeti EPSP-szám lecsökkent és azt a SP (1µmol/l) applikáció nem befolyásolta (15. ábra).



13. ábra Az SR140333 kódjelű specifikus nem-peptid antagonista effektíven gátolta a SP kiváltott EPSP-szám növekedést. Az ábra felső részén az egymást követő EPSP-k között eltelt idő, míg az alsó részén az adott időegységre eső EPSP-k száma van feltüntetve az idő függvényében. Látható, hogy az SR140333 jelenlétében a SP (1μM) nem váltja ki a korábban megfigyelt EPSP-szám növekedést. A szürke oszlopok azokat az időszakaszokat jelzik, amikor a regisztrált neuron tüzelési mintázatát és membránparamétereit állapítottuk meg.



14. ábra Az NK1 receptor szelektív agonistája a SP-hez hasonló EPSP gyakoriság-növekedést idéz elő intermedier szürkeállománybeli neuronokon. Az ábra felső részén az egymást követő EPSP-k között eltelt idő, míg az alsó részén az adott időegységre eső EPSP-k száma van feltüntetve az idő függvényében. Az agonista markáns hatása nem volt kimosható a 10 perces időtartam alatt. A szürke oszlopok azokat az időszakaszokat jelzik, amikor a regisztrált neuron tüzelési mintázatát és membránparamétereit állapítottuk meg.



15. ábra A SP (1µmol/l) okozta EPSP szám növekedés elmaradt TTX (500nmol/l) jelnlétében. Felül az EPSP-k amplitúdója, az ábra középső részén az egymást követő EPSP-k között eltelt idő, míg az alsó részén az adott időegységre eső EPSP-k száma van feltüntetve az idő függvényében. A szürke oszlopok azokat az időszakaszokat jelzik, amikor a regisztrált neuron tüzelési mintázatát és membránparamétereit állapítottuk meg.

4.4.2. SP hatása az intermedier szürkeállomány neuronjainak membránparamétereire

Azután, hogy a SP preszinaptikus hatása igazolódott, megpróbáltuk kideríteni, hogy a posztszinaptikus membránon immunhisztokémiával igazoltan expresszált NK1 receptorokon van-e hatása a SP-nek, befolyásolja-e a regisztrált neuronok valmilyen membránparaméterét. Neuronjainkat a korábbi kisérleteink során megfigyelt tüzelési mintázat csoportokra osztottuk. A 11 vizsgált neuron közül az 1µM SP applikáció során mindhárom megfigyelt tüzelési mintázat csoportba tartozó neuronok bemeneti ellenállása lecsökkent. Legmarkánsabb a "repetitive" csoportba tartozó sejtek esetében volt ez a csökkenés, ahol következményesen a tüzelési mintázat is változott; az AP frekvencia nagymértékben csökkent változatlan amplitúdójú depolarizáló áramimpulzus során. Míg a "phasic" és "slow" csoportban ez a hatás reverzibilisnek bizonyult, addig a "repetitive" csoport neuronjainak ellenállása irreverzibilisen megváltozott a SP alkalmazását követően (16. ábra).



16. ábra SP (1mM) hatása a különböző tüzelési mintázat csoportokba tartozó neuronok membránparamétereire. REP: A "repetitive" csoportba tartozó sejtek SP applikáció eredményeképpen egyre kisebb számú AP-t produkáltak adott amplitúdójú áramimpulzusra 800ms alatt (felül). A sejtek bemeneti ellenállása SP hatásásra irreverzibilisen csökkent (középen). Ennek megfelelően a tüzelési küszöb eléréséhez szükséges áramimpulzus amplitúdója (alul) növekedett. PHA, SLO: A "phasic" és "slow" csoportba tartozó neuronok tüzelési frekvenciájában (felül), bemeneti ellenállásában (középen) és a tüzelési küszöb eléréséhez szükséges áramimpulzus amplitúdójában (alul) csak kismértékű reverzibilis változás volt megfigyelhető a SP applikáció következtében. Az ábra legfelső részén az adott sejtcsoportra jellemző tüzelési mintázat látható.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Hátsógyöki ganglionsejtek SP érzékenysége

Az értekezésben bemutatott eredményeink arra engednek következtetni, hogy fiatal patkányok DRG neuronjainak egy szub-populációja funkcionális NK1 receptorokat expresszál. Mivel immunhisztokémiai eredményeink fiatal állatokból származtak és korábbi in vitro DRG preparátumokon végzett elektrofiziológiai kisérletek eredménye alapján az intracelluláris elvezetések is stabilabbak fiatal állatokból származó preparátumokon (Nagy és mtsai., 1993; Nagy és mtsai., 1996), ezért a kisérletsorozatot kizárólag fiatal patkányokon végeztük.

A jelen kisérletekben használt NK1 receptor ellenes antitest a receptormolekula C-terminálisának 15 aminosavnyi szekvenciájára specifikus (Vigna és mtsai., 1994). Ezt az antitestet alkalmazták korábban gerincvelőben, nucleus trigeminalis caudalis-ban (Zhu és mtsai., 1986), felnőtt patkány DRG-ban illetve perifériás idegben (Carlton és mtsai., 1996; Brown és mtsai., 1995; Littlewood és mtsai., 1995; Szucs és mtsai., 1995). Annak ellenére, hogy a gerincvelőben nagyszámú NK1 receptort mutattak ki az antitesttel, felnőtt patkány DRG-ben nem találtak imunoreaktivitást (Brown és mtsai., 1995). A Brown és mtsai (1995) és a mi adataink közötti eltérés többféleképpen magyarázható. A DRG neuronok NK1 receptor expressziója a posztnatális fejlődés során csökkenhet, mint ahogy azt számos -köztük az NK1- receptor esetében megfigyelték (Kar és Quirion, 1995). A DRG-n belüli immunoreaktivitás csökkenést a receptornak a fejlődés során a szómáról a perifériás és centrális terminálisokba való transzlokációja is eredményezheti.

Kísérleteinkben a teljes DRG sejtpopuláció 1/3-a mutatott NK1 receptor immunopozitivitást, míg intracelluláris elvezetéssel a neuronok 1/5-e bizonyult SP-vel aktiválhatónak. Immunhisztokémiai eredményeink jó összhangban vannak a korábbi leírások többségével, amik szerint a DRG neuronok 30-40%-a érzékeny SP-re (Dray és mtsai., 1982; Kumazawa és mtsai., 1979; Li és mtsai., 1998; Bowie és mtsai., 1994).

Vizsgálatainkban az NK1 receptor immunopozitív neuronok többsége a közepes-kis mérettartományba esett. Összehasonlító morfológai és fiziológiai vizsgálatok alapján a közepes- és kis DRG neuronok Aδ- és C- típusúak (Harper és Lawson, 1985; Cameron és mtsai., 1986; Lawson és Waddel, 1991; Lee és mtsai., 1986). Kísérleteinkben mi is A δ - és C- típusú neuronokban figyeltünk meg depolarizációt illetve tüzelést SP hatására.

A szelektív és hatékony NK1 receptor antagonista RP67580 (Garret és mtsai., 1991; Fardin és mtsai., 1993) csak mintegy 25%-kal csökkentette a hátsó gyökéren SP-vel kiváltott depolarizáció amplitúdóját. Újabb irodalmi adatok szerint ugyanakkor a DRG neuronok egy szub-populációja az összes NK receptor típuson keresztül aktiválható (Brechenmacher és mtsai., 1998). Bár a SP legnagyobb affinitással az NK1 receptorhoz kötődik, képes aktiválni az NK2 és NK3 receptorokat is (Maggi és mtsai., 1993). Ennek megfelelően elképzelhető, hogy a SP kiváltotta válasz RP67580 nagy koncentrációja által sem befolyásolt részéért a DRG sejtek NK2 és NK3 receptorok révén megvalósuló aktivációja felelős. Lehetséges azonban az is, hogy az RP67580 hatékonyabb a központi- mint a perifériás idegrendszerben.

A funkcionális NK1 receptorok jelenléte a DRG neuronokon szükségszerűen felveti élettani jelentőségük kérdését. Az egyik lehetőség, hogy a szenzoros ganglionokon belül expresszálódó NK1 receptorok magukban a ganglionokban játszanak szerepet a szenzoros információfeldolgozásban. Másrészt elképzelhető, hogy ezen receptorok csak átmenetileg, a perifériás illetve a centrális terminálisokba való transzportálást megelőzően expresszálódnak a neuronok szómáján. Brown és mtsai (1995) korábban nem találtak NK1 receptor immunoreaktivitást a primér afferenseken a gerincvelőben. A mi eredményeink szerint Aδ- és C- karakterisztikával bíró DRG neuronok funkcionális NK1 receptorokat expresszálnak. Az a tény, hogy ezen rosttípusok zöme az gerincvelői I-es laminában végződik, ahol a legnagyobb NK1 receptor immunopozitivitás figyelhető meg (Littlewood és mtsai., 1995; Szűcs és mtsai, 1995), további vizsgálatok igényét veti fel.

5.2. NK1 receptor immunoreaktivitás fiatal patkányok lumbális gerincvelőjében

Az NK1 receptorral végzett kísérletek célja az volt, hogy jellemezzük az NK1 receptor immunoreaktivitás eloszlását fiatal patkányok lumbális gerincvelőjében. Általánosságban elmondható, hogy az általunk talált immunopozitivitási mintázat szinte mindenben azonosnak bizonyult a korábban felnőtt állatokban leírttal (Moussaoui és mtsai., 1992; Bleazard és mtsai., 1994; Nakaya és mtsai., 1994; Brown és mtsai., 1995; Todd és mtsai., 1998).

Az NK1 receptor pozitív és a Nissl-festett sejttestek számából meghatározott relatív immunopozitív sejtszám a mi esetünkben körülbelül a felnőtt állatban hasonló vizsgálati eljárással tapasztalt érték (Brown és mtsai., 1995) kétszeresének bizonyult fénymikroszkópos szinten vizsgálva. Ez alapján fiatal patkányokban vagy az NK1 receptort expresszáló neuronok relatív száma nagyobb, vagy pedig az NK1 receptor expresszió szintje több neuronban éri el a detektálhatóság szintjét. Ez a fokozott NK1 receptor expresszió jól egybeesik azokkal az autoradiográfiás eredményekkel, amelyek fiatal állatok lumbális gerincvelőjében 50%-al több SP kötőhelyet mutattak ki mint a felnőtt patkányokéban (Kar és Quirion, 1995).

A fiatal patkányokban talált immunopozitív neuronok többsége ugyanazokba a csoportokba tartozik mint a felnőtt állatokban megfigyeltek, bár néhány laminában akadtak kisebb eltérések (Bleazard és mtsai., 1994; Brown és mtsai., 1995; Littlewood és mtsai., 1995).

Érdekes eredmény, hogy a mélyebb hátsó szarv és az intermedier szürkeállomány bizonyos területein is megfigyelhetők voltak halványan, de határozottan immunopozitív sejttestek. Korábbi irodalmi adatok hasonló jellegű, főleg neuronok sejttestjein megtalálható NK1 receptor immunopozitivitásról számolnak be felnőtt patkány gerincvelőn (Moussaoui és mtsai., 1992), valamint emberi újszülött és felnőtt gerincvelőben egyaránt (Ding és mtsai., 1999). Mivel az ezeken a neuronkon elhelyezkedő NK1 receptorok funkciójáról nem sokat tudunk, célul tűztük ki további kisérleteinkben az intermedier szürkeállományban és az V-VI-os laminákban található neuronok fiziológiai és morfológiai karakterizálását, valamint a rajtuk megtalálható NK1 receptorok esetleges szerepének tisztázását.

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

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

Eredményeink arra utalnak, hogy az intermedier szürkeállomány neuronjai morfológiai és elektrofiziológiai paramétereik alapján heterogén populációt alkotnak. Tüzelési mintázataik alapján négy csoprotot különböztettünk meg. Korábbi riodalmi adatok már beszámoltak "phasic", "repetititive" és "single" tüzelési mintázatokról a gerincvelő felszínes- és mély hátsó szarvában (Hochman és mtsai., 1997; Prescott és Koninck, 2002), valamint hátsó szarvi neurontenyészeteken (Jo és mtsai., 1998). Az általunk megfigyelt "slow" mintázat ugyanakkor legjobb tudomásunk szerint eddig még nem került leírásra.

Természetesen felmerül a kérdés, hogy mennyiben a neuronok intrinsic sajátossága az általuk küszöbfeletti depolarizáló áramimpulzusokra adott AP sorozat, és mennyiben függ ez a válasz a szeletpreparátumokban általunk is megfigyelt, megtartott működő neuronhálózatok aktivitásától. Ha figyelembe vesszük azonban, hogy neuron-kultúrákon -ahol ilyen komplex neuronhálózatok kialakulása nem, vagy csak hosszú idő után valószínű- ugyanezeket a tüzelési mintázatokat figyelték meg (Jo és mtsai., 1998), akkor valószínű, hogy a mintázatok kialakításáért elsősorban a neuronok membránsajátságai és ioncsatorna összetétele felelősek.

és "repetitive" А ...phasic" neuronok sem morfológiájukat, sem membránparamétereiket, sem eloszlásukat tekintve nem különíthetők el olyan élesen az V-VII laminákban, mint a gerincvelő más területein. Erre utal az a tény is, hogy 5 neuront nem tudtunk sem egyik, sem másik kategóriába sorolni, mivel mind a "phasic", mind a "repetitive" neuronok karakterisztikus jegyeit mutatták, mintegy átmenetet képzeve a két csoport között. Így lehet, hogy ez a két tüzelési mintázat egy heterogén sejtpopuláció két szélsőséges megjelenési formáját képviseli. E két, a gerincvelőben mindenütt megtalálható tüzelési mintázatot mutató neuronpopulációt vizsgálva Prescott és Koninck (2002) arra a következtetésre jutottak, hogy lassú szinaptikus potenciálváltozásaikkal és alacsony membrán időállandójukkal ezek a neuronok különösen alkalmasak a szinaptikus bemenetek időbeni szummációjára és integrációjára valamint a stimulus inteznitásának megfelelő válaszra.

Fentiekkel szemben a "single" sejtek képtelenek a fogadott stimulus erősségének és időtartamának a tüzelési frekvencián keresztüli kódólására, de alkalmasak arra, hogy nagy frekvenciájú (pl. "burst"-ölő neuronok) vagy ritmikus bemeneteket kövessenek válaszaikkal (Thomson és mtsai., 1989). Ennek megfelelően

alkalmasak lehetnek szinaptikus bemenetek aktivitásának detektálására (Ruscheweyh és Sandkühler, 2002). Vizsgálatainkban a "single" neuronok többségét az V-VI laminákban találtuk meg. Hasonló tüzelési mintázatú neuronokat a felületes és mély hátsó szarvban, különböző típusú primér afferensek végződési zónájában (Fyffe, 1984) már korábban is leírtak (Hochman és mtsai., 1997; Prescott és Koninck, 2002). Ez a tény megengedi a feltételezést, hogy a "single" neuronok szinaptikus bemeneteinek egy része primér szenzoros neuronokból is származhat. Ezt támasztja alá az is, hogy az Ia típusú gátló interneuronok erős beidegzést kapnak primér afferensektől (Jankowska, 1992), valamint az, hogy ezek az Ia neuronok macska gerincvelőben szintén "single" tüzelési mintázatot mutattak (Jankowska, 2001). Immunhisztokémiai kisérleteink során az V-VI-os laminákban mi is találtunk NK1 receptor immunopozitív sejttesteket.

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

5.4. Intermedier szürkeállománybeli neuronok SP érzékenysége

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

Az NK1 receptorok jelenlétének vizsgálatáról és szerepéről az intermedier szürkeállományban nem sok irodalmi adat áll rendelkezésre. Közel egy évtizeddel ezelőtt néhány közlemény foglalkozott azzal a megfigyeléssel, hogy mellső gyökér regisztrátumokon illetve motoneuronokon végzett intracelluláris elvezetésekben hátsó gyökér vagy primér afferens stimuláció eredményeképpen kialakuló depolarizáció gátolható NK1 receptor antagonistákkal (pl. SR140333, Baranauskas és mtsai., 1995;

RP67580, Hosoki és mtsai., 1994). Ez a megállapítás indirekt utalás volt funkcionális NK1 receptorok jelenétére a mellső szarv sejtjein, köztük a motoneuronokon.

Ugyanakkor néhány közlemény beszámolt arról, hogy SP pozitív terminálisok sűrű hálózata található bizonyos intermedier szürkeállomány neuronok körül patkány L2-4-es szegmentumaiban (Oldfield és mtsai., 1985), illetve SP tartalmú neuronokat és terminálisokat írtak le ezen a területen patkányban, valamint emberi és majom gerincvelőben (Uda és mtsai., 1985; de Lanerolle és mtsai., 1982).

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

1. Az intermedier szürkeállomány neuronjai nagy mennyiségű bemenetet kapnak SP érzékeny neuronoktól, így azok aktivitásának fokozása SP-vel az intermedier szürkeállomány neuronok membránján regisztrált EPSP-k számának nagymértékű megnövekedését idézi elő. Ez a hatás valószínűleg elsősorban NK1 receptoron keresztül valósul meg, mivel az NK1 receptor specifikus antagonistája effektíven gátolta, míg egy hatékony agonista reprodukálta a SP által kiváltott választ. A SP-aktivált preszinaptikus neuronok elhelyezkedésének tisztázása további vizsgálatokat igényel. Lehetséges lokalizációként felmerül a hátsó szarv, valamint maga az intermedier szürkeállomány.

2. A TTX-nal végzett kísérletek eredményei alapján kizárható, hogy AP független transzmitterfelszabadulás (mini EPSP) állna a megnövekedett EPSP szám hátterében,. Bár a vizsgált neuronokon végződő terminálisokon található preszinaptikus NK1 receptor léte nem zárható ki, az immunhisztokémiai jelölések során ebben a laminában dominánsan sejttestes jelölést kaptunk és nem láttunk rostvégződéseket.

3. A SP applikáció a három regisztrált tüzelési mintázat csoportba tartozó neuronok közül legnagyobb mértékben a "repetitive" sejtek bemeneti ellenállását és tüzelési frekvenciáját változtatta meg. Ez a tény igazolni látszik a funkcionális NK1 receptorok jelenlétét az intermedier szürkeállomány neuronjainak egy részében. Annak a kérdésnek a tisztázása, hogy vajon a funkcionális NK1 receptort expresszáló sejtek egybeesnek-e a "repetitive" csoport neuronjaival, további immunhisztokémiával kombinált elektrofiziológiai kísérletek elvégzését igényli.

50

További vizsgálatokat igényel az a megfigyelés is, hogy ritkán tapasztaltuk a hátsó szarvi, és DRG neuronok SP-aktivációjára jellemző elnyújtott depolarizációt.

Mindezeket egybevetve elmondható, hogy a SP "klasszikus" nociceptív információfeldolgozásban betöltött szerepe mellett nagy hatással van a gerincvelő egyéb neuronális hálózatainak működésére is, így valószínűleg a nociceptív információnak a gerincvelő egyéb funkcióiba való integrálásában is részt vehet. Ezt a feltételezést támasztja alá az az irodalmi adat, hogy a C-típusú primér afferensek ingerlésével, illetve SP adagolásával kiváltható flexor reflex érzékenység-fokozódás effektíven gátolható NK1 receptor antagonistával (Wiesenfeld-Hallin és mtsai., 1991). Eddigi eredményeink jól beleilleszthetőek a fent idézett megállapítások rendszerébe.

6. ÖSSZEFOGLALÓ

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

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

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

Fenti eredmények hozzájárulhatnak a tachykininek fájdalominforációfeldolgozásban és nociceptív reflexekben betöltött szerepének jobb megértéséhez.

52

Combined electrophysiological and morphological investigation of substance P (SP) – neurokinin 1 (NK1) receptor interaction in the spinal cord and dorsal root ganglia of the rat

Péter Szűcs, Dr. Department of Anatomy, Histology and Embryology University of Debrecen, Medical and Health Science Centre, Debrecen, Hungary

The results of the present theses demonstrate that a sub-population of DRG neurons expresses functional NK1 receptors in young rats. These neurons belong to the small and medium size cell populations, that previously have been shown to posess type C and A δ fibers, majority of which are terminating in lamina I of the spinal dorsal horn.

We used immunohistochelmical methods to investigate the distribution of NK1 receptor immunorceativity in the spinal cord of young rats. We found strong immunolabelling in the superficial laminae, especially in lamina I where mainly fibers appeared to be immnunopsitive. This distribution pattern was similar to that reported in older animals. We found NK1 receptor immunopositive cell bodies in laminae V-VI and in the intermedier gray matter of the lumbar spinal cord. We applied both morphological and electrophysiological techniques in order to characterize these neurons.

Upon the basis of their firing pattern (response to 800ms long suprathreshold depolarising current steps) we distinguished four groups of the recorded neurons, three of which have been previously reported in different areas of the spinal cord. In our experiments we described a fourth group of neurons with a so-called "slow" firing pattern, characteristic morphological features and specific laminar distirbution. To our best knowledge this is the first time that "slow" firing neurons have been reported in the spinal cord.

We observed a large increase in the number of EPSPs reaching the neurons of the intermedier gray matter during SP application suggesting a presynaptic effect of SP. In certain cells we documented changes in the membrane resistance and friring threshold that are likely to be connected to the presence of functional NK1 receptors.

We hope that our results provide more data for a better understanding of the role of tachykinins in nociceptiv information processing and reflexes.

7. IRODALOMJEGYZÉK

7.1. Hivatkozott közlemények

Abbadie, C., Brown, J.L., Mantyh, P.W. & Basbaum, A.I. (1996) Spinal cord substance P receptor immunoreactivity increases in both inflammatory and nerve injury models of persistent pain. *Neuroscience*, **70**, 201-209.

Andersen, R.K., Lund, J.P. & Puil, E. (1978) Enkephalin and substance P effects related to trigeminal pain. *Can.J Physiol Pharmacol*, **56**, 216-222.

Baranauskas, G., Traversa, U., Rosati, A.M. & Nistri, A. (1995) An NK1 receptordependent component of the slow excitation recorded intracellularly from rat motoneurons following dorsal root stimulation. *Eur.J Neurosci*, **7**, 2409-2417.

Baranauskas, G. & Nistri, A. (1996) NMDA receptor-independent mechanisms responsible for the rate of rise of cumulative depolarization evoked by trains of dorsal root stimuli on rat spinal motoneurones. *Brain Res*, **738**, 329-332.

Barber,R.P., Vaughn,J.E., Slemmon,J.R., Salvaterra,P.M., Roberts,E. & Leeman,S.E. (1979) The origin, distribution and synaptic relationships of substance P axons in rat spinal cord. *J Comp Neurol.*, **184**, 331-351.

Barbut, D., Polak, J.M. & Wall, P.D. (1981) Substance P in spinal cord dorsal horn decreases following peripheral nerve injury. *Brain Res*, **205**, 289-298.

Battaglia,G. & Rustioni,A. (1988) Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey. *J Comp Neurol.*, **277**, 302-312.

Beal,J.A. (1983) Identification of presumptive long axon neurons in the substantia gelatinosa of the rat lumbosacral spinal cord: a Golgi study. *Neurosci Lett.*, **41**, 9-14.

Bishop,A.E., Hamid,Q.A., Adams,C., Bretherton-Watt,D., Jones,P.M., Denny,P., Stamp,G.W., Hurt,R.L., Grimelius,L., Harmar,A.J. & . (1989) Expression of tachykinins by ileal and lung carcinoid tumors assessed by combined in situ hybridization, immunocytochemistry, and radioimmunoassay. *Cancer*, **63**, 1129-1137.

Bjorklund,H., Dalsgaard,C.J., Jonsson,C.E. & Hermansson,A. (1986) Sensory and autonomic innervation of non-hairy and hairy human skin. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res*, **243**, 51-57.

Bleazard,L., Hill,R.G. & Morris,R. (1994) The correlation between the distribution of the NK1 receptor and the actions of tachykinin agonists in the dorsal horn of the rat indicates that substance P does not have a functional role on substantia gelatinosa (lamina II) neurons. *J Neurosci*, **14**, 7655-7664.

Bonner, T.I., Affolter, H.U., Young, A.C. & Young, W.S., III (1987) A cDNA encoding the precursor of the rat neuropeptide, neurokinin B. *Brain Res*, **388**, 243-249.

Bonner, T.I. (1989) The molecular basis of muscarinic receptor diversity. *Trends Neurosci.*, **12**, 148-151.

Bowie, D., Feltz, P. & Schlichter, R. (1994) Subpopulations of neonatal rat sensory neurons express functional neurotransmitter receptors which elevate intracellular calcium. *Neuroscience*, **58**, 141-149.

Brechenmacher, C., Larmet, Y., Feltz, P. & Rodeau, J.L. (1998) Cultured rat sensory neurones express functional tachykinin receptor subtypes 1, 2 and 3. *Neurosci Lett.*, **241**, 159-162.

Brimijoin,S., Lundberg,J.M., Brodin,E., Hokfelt,T. & Nilsson,G. (1980) Axonal transport of substance P in the vagus and sciatic nerves of the guinea pig. *Brain Res*, **191**, 443-457.

Brodin,E., Lindefors,N., Dalsgaard,C.J., Theodorsson-Norheim,E. & Rosell,S. (1986) Tachykinin multiplicity in rat central nervous system as studied using antisera raised against substance P and neurokinin A. *Regul.Pept.*, **13**, 253-272. Brown,A.G. (1981) Organisation of the Spinal Cord. The Anatomy and Physiology of Identified Neurons Springer, New York.

Brown,J.L., Liu,H., Maggio,J.E., Vigna,S.R., Mantyh,P.W. & Basbaum,A.I. (1995) Morphological characterization of substance P receptor-immunoreactive neurons in the rat spinal cord and trigeminal nucleus caudalis. *J Comp Neurol.*, **356**, 327-344.

Buck,S.H. & Burcher,E. (1986) The tachykinins: a family of peptides with a brood of 'receptors'. *Trends in Pharmacological Sciences*, **7**, 65-68.

Cameron,A.A., Leah,J.D. & Snow,P.J. (1986) The electrophysiological and morphological characteristics of feline dorsal root ganglion cells. *Brain Res*, **362**, 1-6.

Carlton,S.M., Zhou,S. & Coggeshall,R.E. (1996) Localization and activation of substance P receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. *Brain Res*, **734**, 103-108.

Chang,M.M. & Leeman,S.E. (1970) Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P. *J Biol.Chem.*, **245**, 4784-4790.

Chang,M.M., Leeman,S.E. & Niall,H.D. (1971) Amino-acid sequence of substance P. *Nat.New Biol.*, **232**, 86-87.

Chertien, M., Sikstrom, R., Lazure, C., Mbikay, M., Nasiannet, S., Marcinkiewicz, M. & Seida, N. (1989) Expression of the diversity of neuronal and hormonal peptides in the cleavage of precursor molecules. In Martinex, J. (ed), *Peptide Hormones as Prohormones*. Ellis Horwood, London, pp. 1-24.

Cooper,P.E., Fernstrom,M.H., Rorstad,O.P., Leeman,S.E. & Martin,J.B. (1981) The regional distribution of somatostatin, substance P and neurotensin in human brain. *Brain Res*, **218**, 219-232.

Creutzfeldt,W. (1996) Carcinoid tumors: development of our knowledge. *World J Surg.*, **20**, 126-131.

Croul,S., Sverstiuk,A., Radzievsky,A. & Murray,M. (1995) Modulation of neurotransmitter receptors following unilateral L1-S2 deafferentation: NK1, NK3, NMDA, and 5HT1a receptor binding autoradiography. *J Comp Neurol.*, **361**, 633-644.

Cuello,A.C., Jessell,T.M., Kanazawa,I. & Iversen,L.L. (1977) Substance P: localization in synaptic vesicles in rat central nervous system. *J Neurochem.*, **29**, 747-751.

de Lanerolle, N.C. & LaMotte, C.C. (1982) The morphological relationships between substance P immunoreactive processes and ventral horn neurons in the human and monkey spinal cord. *J Comp Neurol*, **207**, 305-13.

Ding, Y.Q., Zheng, H.X., Wang, D.S., Xu, J.Q., Gong, L.W., Lu, Y., Qin, B.Z., Shi, J., Li, H.L., Li, J.S., Shigemoto, R., Kaneko, T. & Mizuno, N. (1999) The distribution of substance P receptor (NK1)-like immunoreactive neurons in the newborn and adult human spinal cord. *Neurosci Lett*, **266**, 133-6.

Douglas,F.L., Palkovits,M. & Brownstein,M.J. (1982) Regional distribution of substance P-like immunoreactivity in the lower brainstem of the rat. *Brain Res*, **245**, 376-378.

Dray, A. & Pinnock, R.D. (1982) Effects of substance P on adult rat sensory ganglion neurones in vitro. *Neurosci.Lett.*, **33**, 61-66.

Dun,N.J. & Minota,S. (1981) Effects of substance P on neurones of the inferior mesenteric ganglia of the guinea-pig. *J Physiol*, **321**, 259-271.

Elliott,P.J., Mason,G.S., Graham,E.A., Turpin,M.P. & Hagan,R.M. (1992) Modulation of the rat mesolimbic dopamine pathway by neurokinins. *Behav.Brain Res*, **51**, 77-82.

Emson,P.C., Arregui,A., Clement-Jones,V., Sandberg,B.E. & Rossor,M. (1980) Regional distribution of methionine-enkephalin and substance P-like immunoreactivity in normal human brain and in Huntington's disease. *Brain Res*, **199**, 147-160. Fardin,V., Foucault,F., Bock,M.D., Jolly,A., Flamand,O., Clerc,F. & Garret,C. (1993) Variations in affinities for the NK1 receptor: differences between the non-peptide substance P antagonists RP 67580 and CP-96,345 and the agonist septide. *Regul.Pept.*, **46**, 300-303.

Fulton,B.P. (1987) Postnatal changes in conduction velocity and soma action potential parameters of rat dorsal root ganglion neurones. *Neurosci Lett.*, **73**, 125-130.

Fyffe,R.E.W. (1984) Afferent fibres. In Davidoff,R.A. (ed), *Handbook of the Spinal Cord*. MArcel Dekker Inc., New York, pp. 79-136.

Gale,J.S., Bird,E.D., Spoke,E.G., Ivejsen,L.L. & Jessel,T. (1978) Human brain substance P: distribution in controls and Huntington's chorea. *J Neurochem.*, **30**, 633-634.

Gamse,R., Mroz,E., Leeman,S. & Lembeck,F. The intestine as source of immunoreactive substance P in plasma of the cat.

Gamse, R., Saria, A., Bucsics, A. & Lembeck, F. (1981) Substance P in tumors: pheochromocytoma and carcinoid. *Peptides*, **2 Suppl 2**, 275-280.

Garret, C., Carruette, A., Fardin, V., Moussaoui, S., Peyronel, J.F., Blanchard, J.C. & Laduron, P.M. (1991) Pharmacological properties of a potent and selective nonpeptide substance P antagonist. *Proc Natl.Acad Sci U.S.A*, **88**, 10208-10212.

Gobel, S. (1978) Golgi studies of the neurons in layer II of the dorsal horn of the medulla (trigeminal nucleus caudalis). *J Comp Neurol.*, **180**, 395-413.

Harada, Y., Takahashi, T., Kuno, M., Nakayama, K., Masu, Y. & Nakanishi, S. Expression of two different tachykinin receptors in Xenopus oocytes by exogenous mRNAs.

Harmar,A., Schofield,J.G. & Keen,P. (1981) Substance P biosynthesis in dorsal root ganglia: an immunochemical study of [35S]methionine and [3H]proline incorporation in vitro. *Neuroscience*, **6**, 1917-1922.

Harper, A.A. & Lawson, S.N. (1985) Electrical properties of rat dorsal root ganglion neurones with different peripheral nerve conduction velocities. *J Physiol*, **359**, 47-63.

Heath,M.J., Lints,T.J., Lee,C.J. & Dodd,J. (1995) Functional expression of the tachykinin NK1 receptor by floor plate cells in the embryonic rat spinal cord and brainstem. *J Physiol*, **486** (**Pt 1**), 139-148.

Herrero, JF, Laird, JMA, De Felipe, C, Smith, AJ, Hunt, SP, and Cervero, F. Lack of wind up of somatic nociceptive reflexes and persistence of visceral nociception in NK1 receptor knockout mice. Soc Neurosci Abst 23, 2354. 1997. Ref Type: Abstract

Hochman, S., Garraway, S.M. & Pockett, S. (1997) Membrane properties of deep dorsal horn neurons from neonatal rat spinal cord in vitro. *Brain Res*, **767**, 214-219.

Hokfelt,T., Holets,V.R., Staines,W., Meister,B., Melander,T., Schalling,M., Schultzberg,M., Freedman,J., Bjorklund,H., Olson,L. & . Coexistence of neuronal messengers--an overview.

Hokfelt,T., Kellerth,J.O., Nilsson,G. & Pernow,B. (1975) Substance p: localization in the central nervous system and in some primary sensory neurons. *Science*, **190**, 889-890.

Holton, P. (1959) Further observations on substance P in degenerating nerve. *J Physiol*, **149**, 35.

Holzer, P. (1991) Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev.*, **43**, 143-201.

Holzer, P. & Holzer-Petsche, U. (1997) Tachykinins in the gut. Part II. Roles in neural excitation, secretion and inflammation. *Pharmacol Ther.*, **73**, 219-263.

Holzer, P. & Holzer-Petsche, U. (1997) Tachykinins in the gut. Part I. Expression, release and motor function. *Pharmacol Ther.*, **73**, 173-217.

Hosoki,R., Yanagisawa,M., Guo,J.Z., Yoshioka,K., Maehara,T. & Otsuka,M. (1994) Effects of RP 67580, a tachykinin NK1 receptor antagonist, on a primary afferentevoked response of ventral roots in the neonatal rat spinal cord. *Br.J Pharmacol*, **113**, 1141-1146. Hylden, J.L. & Wilcox, G.L. (1981) Intrathecal substance P elicits a caudally-directed biting and scratching behavior in mice. *Brain Res*, **217**, 212-215.

Inagaki,S., Sakanaka,M., Shiosaka,S., Senba,E., Takatsuki,K., Takagi,H., Kawai,Y., Minagawa,H. & Tohyama,M. (1982) Ontogeny of substance P-containing neuron system of the rat: immunohistochemical analysis--I. Forebrain and upper brain stem. *Neuroscience*, **7**, 251-277.

Jankowska, E. (1992) Interneuronal relay in spinal pathways from proprioceptors. *Prog.Neurobiol.*, **38**, 335-378.

Jankowska, E. (2001) Spinal interneuronal systems: identification, multifunctional character and reconfigurations in mammals. *J Physiol*, **533**, 31-40.

Jessell,T., Tsunoo,A., Kanazawa,I. & Otsuka,M. (1979) Substance P: depletion in the dorsal horn of rat spinal cord after section of the peripheral processes of primary sensory neurons. *Brain Res*, **168**, 247-259.

Jo,Y.H., Stoeckel,M.E. & Schlichter,R. (1998) Electrophysiological properties of cultured neonatal rat dorsal horn neurons containing GABA and met-enkephalin-like immunoreactivity. *J Neurophysiol.*, **79**, 1583-1586.

Kage,R., McGregor,G.P., Thim,L. & Conlon,J.M. (1988) Neuropeptide-gamma: a peptide isolated from rabbit intestine that is derived from gamma-preprotachykinin. *J Neurochem.*, **50**, 1412-1417.

Kanazawa,I. & Jessell,T. (1976) Post mortem changes and regional distribution of substance P in the rat and mouse nervous system. *Brain Res*, **117**, 362-367.

Kangawa,K., Minamino,N., Fukuda,A. & Matsuo,H. (1983) Neuromedin K: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. *Biochem.Biophys.Res Commun.*, **114**, 533-540.

Kar,S. & Quirion,R. (1995) Neuropeptide receptors in developing and adult rat spinal cord: an in vitro quantitative autoradiography study of calcitonin gene-related peptide, neurokinins, mu-opioid, galanin, somatostatin, neurotensin and vasoactive intestinal polypeptide receptors. *J Comp Neurol.*, **354**, 253-281.

Kawaguchi, Y., Hoshimaru, M., Nawa, H. & Nakanishi, S. (1986) Sequence analysis of cloned cDNA for rat substance P precursor: existence of a third substance P precursor. *Biochem.Biophys.Res Commun.*, **139**, 1040-1046.

Kimura,S., Okada,M., Sugita,Y., Kanazawa,I. & Munekata E (1983) Novel neuropeptides, neurokinin a and b, isolated from porcine spinal cord. *Proc Jpn Acad B*, **59**, 101-104.

Kjaerulff,O., Barajon,I. & Kiehn,O. Sulphorhodamine-labelled cells in the neonatal rat spinal cord following chemically induced locomotor activity in vitro.

Kotani,H., Hoshimaru,M., Nawa,H. & Nakanishi,S. (1986) Structure and gene organization of bovine neuromedin K precursor. *Proc Natl.Acad Sci.U.S.A*, **83**, 7074-7078.

Krause, J.E., Chirgwin, J.M., Carter, M.S., Xu, Z.S. & Hershey, A.D. (1987) Three rat preprotachykinin mRNAs encode the neuropeptides substance P and neurokinin A. *Proc Natl.Acad Sci.U.S.A*, **84**, 881-885.

Kumazawa, T. & Mizumura, K. (1979) Effects of synthetic substance P on unitdischarges of testicular nociceptors of dogs. *Brain Res*, **170**, 553-557.

Lawson,S.N. & Waddell,P.J. (1991) Soma neurofilament immunoreactivity is related to cell size and fibre conduction velocity in rat primary sensory neurons. *J Physiol*, 435, 41-63.

Lecci,A., Giuliani,S., Patacchini,R., Viti,G. & Maggi,C.A. (1991) Role of NK1 tachykinin receptors in thermonociception: effect of (+/-)- CP 96,345, a non-peptide substance P antagonist, on the hot plate test in mice. *Neurosci Lett.*, **129**, 299-302.

Lee,K.H., Chung,K., Chung,J.M. & Coggeshall,R.E. (1986) Correlation of cell body size, axon size, and signal conduction velocity for individually labelled dorsal root ganglion cells in the cat. *J Comp Neurol.*, **243**, 335-346.

Lembeck,F. (1953) Zur Frage der zentralen Ubertragung afferenter Impulse III. Mitteilung. Das Vorkommen und die Bedeutung der Substanz P in den dorsalen Wurzeln des Ruckenmarks. *Arch Exp Pathol Pharmakol*, **219**, 197-213. Li,H.S. & Zhao,Z.Q. (1998) Small sensory neurons in the rat dorsal root ganglia express functional NK-1 tachykinin receptor. *Eur.J Neurosci*, **10**, 1292-1299.

Lima,D. & Coimbra,A. (1986) A Golgi study of the neuronal population of the marginal zone (lamina I) of the rat spinal cord. *J Comp Neurol.*, **244**, 53-71.

Lindefors,N., Brodin,E., Theodorsson-Norheim,E. & Ungerstedt,U. (1985) Regional distribution and in vivo release of tachykinin-like immunoreactivities in rat brain: evidence for regional differences in relative proportions of tachykinins. *Regul.Pept.*, **10**, 217-230.

Littlewood,N.K., Todd,A.J., Spike,R.C., Watt,C. & Shehab,S.A. (1995) The types of neuron in spinal dorsal horn which possess neurokinin-1 receptors. *Neuroscience*, **66**, 597-608.

Liu-Chen,L.Y., Liszczak,T.M., King,J.C. & Moskowitz,M.A. (1986) Immunoelectron microscopic study of substance P-containing fibers in feline cerebral arteries. *Brain Res*, **369**, 12-20.

Ma,W., Ribeiro-Da-Silva,A., De Koninck,Y., Radhakrishnan,V., Henry,J.L. & Cuello,A.C. (1996) Quantitative analysis of substance P-immunoreactive boutons on physiologically characterized dorsal horn neurons in the cat lumbar spinal cord. *J Comp Neurol.*, **376**, 45-64.

Maggi,C.A. & Meli,A. The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons.

Maggi, C., Patacchini, R., Rovero, P. & Giazchetti, A. (1993) Tachykinin receptors and tachykinin receptor antagonists. *J Autonom Pharmacol*, **13**, 23-93.

Maggio,J.E. (1985) "Kassinin" in mammals: the newest tachykinins. *Peptides*, **6 Suppl 3**, 237-243.

Maggio, J.E. (1988) Tachykinins. Annu. Rev. Neurosci., 11, 13-28.

Mantyh,P.W., DeMaster,E., Malhotra,A., Ghilardi,J.R., Rogers,S.D., Mantyh,C.R., Liu,H., Basbaum,A.I., Vigna,S.R., Maggio,J.E. & . (1995) Receptor endocytosis and dendrite reshaping in spinal neurons after somatosensory stimulation. *Science*, **268**, 1629-1632.

Manzini,S., Conti,S., Maggi,C.A., Abelli,L., Somma,V., Del Bianco,E. & Geppetti,P. (1989) Regional differences in the motor and inflammatory responses to capsaicin in guinea pig airways. Correlation with content and release of substance P-like immunoreactivity. *Am.Rev.Respir.Dis.*, **140**, 936-941.

Marshall,G.E., Shehab,S.A., Spike,R.C. & Todd,A.J. (1996) Neurokinin-1 receptors on lumbar spinothalamic neurons in the rat. *Neuroscience*, **72**, 255-263.

Martin,F.C., Charles,A.C., Sanderson,M.J. & Merrill,J.E. (1992) Substance P stimulates IL-1 production by astrocytes via intracellular calcium. *Brain Res*, **599**, 13-18.

Maxwell,D.J. (1985) Combined light and electron microscopy of Golgi-labelled neurons in lamina III of the feline spinal cord. *J Anat.*, **141**, 155-169.

McCarthy,P.W. & Lawson,S.N. (1989) Cell type and conduction velocity of rat primary sensory neurons with substance P-like immunoreactivity. *Neuroscience*, **28**, 745-753.

Minota,S., Dun,N.J. & Karczmar,A.G. (1981) Substance P-induced depolarization in sympathetic neurons: not simple K- inactivation. *Brain Res*, **216**, 224-228.

Moussaoui,S.M., Hermans,E., Mathieu,A.M., Bonici,B., Clerc,F., Guinet,F., Garret,C. & Laduron,P.M. (1992) Polyclonal antibodies against the rat NK1 receptor: characterization and localization in the spinal cord. *Neuroreport*, **3**, 1073-1076.

Murase,K., Ryu,P.D. & Randic,M. (1986) Substance P augments a persistent slow inward calcium-sensitive current in voltage-clamped spinal dorsal horn neurons of the rat. *Brain Res*, **365**, 369-376.

Murase,K., Ryu,P.D. & Randic,M. (1989) Tachykinins modulate multiple ionic conductances in voltage-clamped rat spinal dorsal horn neurons. *J Neurophysiol.*, **61**, 854-865.

Nagy,I., Urban,L. & Woolf,C.J. (1993) Morphological and membrane properties of young rat lumbar and thoracic dorsal root ganglion cells with unmyelinated axons. *Brain Res*, **609**, 193-200.

Nagy,I., Maggi,C.A., Dray,A., Woolf,C.J. & Urban,L. (1993) The role of neurokinin and N-methyl-D-aspartate receptors in synaptic transmission from capsaicin-sensitive primary afferents in the rat spinal cord in vitro. *Neuroscience*, **52**, 1029-1037.

Nagy,I., Miller,B.A. & Woolf,C.J. (1994) NK1 and NK2 receptors contribute to Cfibre evoked slow potentials in the spinal cord. *Neuroreport*, **5**, 2105-2108.

Nagy,I., Dray,A. & Urban,L. (1995) Possible branching of myelinated primary afferent fibres in the dorsal root of the rat. *Brain Research*, **703**, 223-226.

Nakajima,Y., Nakajima,S. & Inoue,M. (1988) Pertussis toxin-insensitive G protein mediates substance P-induced inhibition of potassium channels in brain neurons. *Proc Natl.Acad Sci U.S.A*, **85**, 3643-3647.

Nakanishi,S., Ohkubo,H., Kakizuka,A., Yokota,Y., Shigemoto,R., Sasai,Y. & Takumi,T. (1990) Molecular characterization of mammalian tachykinin receptors and a possible epithelial potassium channel. *Recent Prog.Horm.Res*, **46**, 59-83.

Nakanishi,S. (1991) Mammalian tachykinin receptors. *Annu.Rev.Neurosci.*, **14**, 123-136.

Nakaya,Y., Kaneko,T., Shigemoto,R., Nakanishi,S. & Mizuno,N. (1994) Immunohistochemical localization of substance P receptor in the central nervous system of the adult rat. *J Comp Neurol.*, **347**, 249-274.

Narumi,S. & Fujita,T. (1978) Stimulatory effects of substance P and nerve growth factor (NGF) on neurite outgrowth in embryonic chick dorsal root ganglia. *Neuropharmacology*, **17**, 73-76.

Nawa,H., Hirose,T., Takashima,H., Inayama,S. & Nakanishi,S. (1983) Nucleotide sequences of cloned cDNAs for two types of bovine brain substance P precursor. *Nature*, **306**, 32-36.

Nawa,H., Doteuchi,M., Igano,K., Inouye,K. & Nakanishi,S. (1984) Substance K: a novel mammalian tachykinin that differs from substance P in its pharmacological profile. *Life Sci*, **34**, 1153-1160.

Nowak,L.M. & Macdonald,R.L. (1982) Substance P: ionic basis for depolarizing responses of mouse spinal cord neurons in cell culture. *J Neurosci.*, **2**, 1119-1128.

O'Dowd,B.F., Lefkowitz,R.J. & Caron,M.G. (1989) Structure of the adrenergic and related receptors. *Annu.Rev.Neurosci.*, **12**, 67-83.

Oldfield,B.J., Sheppard,A. & Nilaver,G. (1985) A study of the substance P innervation of the intermediate zone of the thoracolumbar spinal cord. *J Comp Neurol*, **236**, 127-40.

Olgart,L., Gazelius,B., Brodin,E. & Nilsson,G. (1977) Release of substance P-like immunoreactivity from the dental pulp. *Acta Physiol Scand.*, **101**, 510-512.

Otsuka, M. & Konishi, S. (1976) Substance P and excitatory transmitter of primary sensory neurons. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.*, **40**, 135-143.

Otsuka, M. & Yoshioka, K. (1993) Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol Rev.*, **73**, 229-308.

Oury-Donat,F., Lefevre,I.A., Thurneyssen,O., Gauthier,T., Bordey,A., Feltz,P., Emonds-Alt,X., Le Fur,G. & Soubrie,P. (1994) SR 140333, a novel, selective, and potent nonpeptide antagonist of the NK1 tachykinin receptor: characterization on the U373MG cell line. *J Neurochem.*, **62**, 1399-1407.

Pernow, B. (1983) Substance P. Pharmacol Rev., 35, 85-141.

Piercey, M.F., Dobry, P.J., Schroeder, L.A. & Einspahr, F.J. (1981) Behavioral evidence that substance P may be a spinal cord sensory neurotransmitter. *Brain Res*, **210**, 407-412.

Polgar, E., Szucs, P., Urban, L., Matesz, K. & Nagy, I. (1999) Immunohistochemical localization of neurokinin-l receptor in the lumbar spinal cord of young rats: morphology and distribution. *Somatosens.Mot.Res*, **16**, 361-368.

Prescott,S.A. & De Koninck,Y. (2002) Four cell types with distinctive membrane properties and morphologies in lamina I of the spinal dorsal horn of the adult rat. *J Physiol*, **539**, 817-836.

Quirion, R. (1985) Multiple tachykinin receptors. *Trends in Neurosciences*, **8**, 183-185.

Ramón y Cajal,S. (1909) *Histologie du Systéme Nerveux de l'Homme et des Vertébrés* Maloine, Paris.

Randic, M., Hecimovic, H. & Ryu, P.D. (1990) Substance P modulates glutamateinduced currents in acutely isolated rat spinal dorsal horn neurones. *Neurosci Lett.*, **117**, 74-80.

Regoli, D., Nguyen, Q. & Jukic, D. (1994) Neurokinin receptor subtypes characterized by biological assays. *Life Sci*, **54**, 2035-2047.

Rethelyi,M. & Szentagothai,J. (1969) The large synaptic complexes of the substantia gelatinosa. *Exp Brain Res*, **7**, 258-274.

Rethelyi,M. & Szentagothai,J. (1973) Distribution and connections of afferent fibers in the spinal cord. In Iggo,A. (ed), *Handbook of Sensory Physiology Vol. II*. Springer, New York, pp. 207-252.

Ruscheweyh, R. & Sandkuhler, J. Lamina-specific membrane and discharge properties of rat spinal dorsal horn neurones in vitro.

Rusin,K.I., Bleakman,D., Chard,P.S., Randic,M. & Miller,R.J. (1993) Tachykinins potentiate N-methyl-D-aspartate responses in acutely isolated neurons from the dorsal horn. *J Neurochem.*, **60**, 952-960.

Sakanaka,M., Inagaki,S., Shiosaka,S., Senba,E., Takagi,H., Takatsuki,K., Kawai,Y., Iida,H., Hara,Y. & Tohyama,M. (1982) Ontogeny of substance P-containing neuron system of the rat: immunohistochemical analysis--II. Lower brain stem. *Neuroscience*, **7**, 1097-1126.

Sasai, Y. & Nakanishi, S. (1989) Molecular characterization of rat substance K receptor and its mRNAs. *Biochem.Biophys.Res Commun.*, **165**, 695-702.

Schoenen,J. (1982) The dendritic organization of the human spinal cord: the dorsal horn. *Neuroscience*, **7**, 2057-2087.

Seidah,N., Day,R., Marcinkiewicz,M. & Chretien,M. (1993) Mammalian paired basic amino acid convertases of prohormones and proproteins. *Ann N Y Acad Sci*, **680**, 135-146.

Shigemoto, R., Yokota, Y., Tsuchida, K. & Nakanishi, S. (1990) Cloning and expression of a rat neuromedin K receptor cDNA. *J Biol.Chem.*, **265**, 623-628.

Sivam,S.P., Krause,J.E., Takeuchi,K., Li,S., McGinty,J.F. & Hong,J.S. (1989) Lithium increases rat striatal beta- and gamma-preprotachykinin messenger RNAs. *J Pharmacol Exp.Ther.*, **248**, 1297-1301.

Spigelman,I. & Puil,E. (1990) Ionic mechanism of substance P actions on neurons in trigeminal root ganglia. *J Neurophysiol.*, **64**, 273-281.

Stanfield,P.R., Nakajima,Y. & Yamaguchi,K. (1985) Substance P raises neuronal membrane excitability by reducing inward rectification. *Nature*, **315**, 498-501.

Steiner, D.F., Smeekens, S.P., Ohagi, S. & Chan, S.J. (1992) The new enzymology of precursor processing endoproteases. *J Biol.Chem.*, **267**, 23435-23438.

Stucky,C.L., Galeazza,M.T. & Seybold,V.S. (1993) Time-dependent changes in Bolton-Hunter-labeled 125I-substance P binding in rat spinal cord following unilateral adjuvant-induced peripheral inflammation. *Neuroscience*, **57**, 397-409. Szucs, P., Polgar, E., Urban, L., Jeftinija, J., and Nagy, I. Spinal cord neurons in which interaction between N-methyl-D-aspartate and neurokinin-1 receptors may occur. Soc Neurosci Abst 21, 379. 1995. Ref Type: Abstract

Taoka, M., Song, S.Y., Kubota, M., Minegishi, A., Yamakuni, T. & Konishi, S. (1996) Increased level of neurokinin-1 tachykinin receptor gene expression during early postnatal development of rat brain. *Neuroscience*, **74**, 845-853.

Tatemoto,K., Lundberg,J.M., Jornvall,H. & Mutt,V. (1985) Neuropeptide K: isolation, structure and biological activities of a novel brain tachykinin. *Biochem.Biophys.Res Commun.*, **128**, 947-953.

Thompson, S.W., Dray, A. & Urban, L. (1994) Injury-induced plasticity of spinal reflex activity: NK1 neurokinin receptor activation and enhanced A- and C-fiber mediated responses in the rat spinal cord in vitro. *J Neurosci*, **14**, 3672-3687.

Thomson,A.M., West,D.C. & Headley,P.M. (1989) Membrane Characteristics and Synaptic Responsiveness of Superficial Dorsal Horn Neurons in a Slice Preparation of Adult Rat Spinal Cord. *Eur.J Neurosci*, **1**, 479-488.

Todd,A.J. & Lewis,S.G. (1986) The morphology of Golgi-stained neurons in lamina II of the rat spinal cord. *J Anat.*, **149**, 113-119.

Todd,A.J., Spike,R.C. & Polgar,E. (1998) A quantitative study of neurons which express neurokinin-1 or somatostatin sst2a receptor in rat spinal dorsal horn. *Neuroscience*, **85**, 459-473.

Torrens,Y., Daguet De Montety,M.C., el Etr,M., Beaujouan,J.C. & Glowinski,J. (1989) Tachykinin receptors of the NK1 type (substance P) coupled positively to phospholipase C on cortical astrocytes from the newborn mouse in primary culture. *J Neurochem.*, **52**, 1913-1918.

Uda,K., Okamura,H. & Ibata,Y. (1985) Immunocytochemical localization of substance P in the rat spinal cord with special reference to fibers within the ventral column of the rostral lumbar segments. *Neurosci Lett*, **57**, 185-90.

Urban,L. & Randic,M. (1984) Slow excitatory transmission in rat dorsal horn: possible mediation by peptides. *Brain Res*, **290**, 336-341.

Vigna,S.R., Bowden,J.J., McDonald,D.M., Fisher,J., Okamoto,A., McVey,D.C., Payan,D.G. & Bunnett,N.W. (1994) Characterization of antibodies to the rat substance P (NK-1) receptor and to a chimeric substance P receptor expressed in mammalian cells. *J Neurosci*, **14**, 834-845.

Whitty,C.J., Walker,P.D., Goebel,D.J., Poosch,M.S. & Bannon,M.J. (1995) Quantitation, cellular localization and regulation of neurokinin receptor gene expression within the rat substantia nigra. *Neuroscience*, **64**, 419-425.

Wienrich, M. & Kettenmann, H. (1989) Activation of substance P receptors leads to membrane potential responses in cultured astrocytes. *Glia*, **2**, 155-160.

Wiesenfeld-Hallin,Z., Xu,X.J., Hakanson,R., Feng,D.M. & Folkers,K. (1991) Tachykinins mediate changes in spinal reflexes after activation of unmyelinated muscle afferents in the rat. *Acta Physiol Scand.*, **141**, 57-61.

Willis, W.D. & Coggeshall, R.E. (1991) Sensory Mechanism of the Spinal Cord Plenum, London.

Wolf,S.S., Moody,T.W., Quirion,R. & O'Donohue,T.L. (1985) Biochemical characterization and autoradiographic localization of central substance P receptors using [125I]physalaemin. *Brain Res*, **332**, 299-307.

Womack, M.D., MacDermott, A.B. & Jessell, T.M. (1988) Sensory transmitters regulate intracellular calcium in dorsal horn neurons. *Nature*, **334**, 351-353.

Xu,X.J., Dalsgaard,C.J. & Wiesenfeld-Hallin,Z. Intrathecal CP-96,345 blocks reflex facilitation induced in rats by substance P and C-fiber-conditioning stimulation.

Xu,X.J., Dalsgaard,C.J. & Wiesenfeld-Hallin,Z. (1992) Spinal substance P and Nmethyl-D-aspartate receptors are coactivated in the induction of central sensitization of the nociceptive flexor reflex. *Neuroscience*, **51**, 641-648. Yamamoto, T. & Yaksh, T.L. (1991) Stereospecific effects of a nonpeptidic NK1 selective antagonist, CP- 96,345: antinociception in the absence of motor dysfunction. *Life Sci*, **49**, 1955-1963.

Yashpal,K., Kar,S., Quirion,R., Hui-Chan,C.W. & Henry,J.L. (1994) Noxious stimulation decreases substance P binding in rat spinal dorsal horn: competition by endogenous ligand? *Neuroreport*, **5**, 2101-2104.

Yokota, Y., Sasai, Y., Tanaka, K., Fujiwara, T., Tsuchida, K., Shigemoto, R., Kakizuka, A., Ohkubo, H. & Nakanishi, S. (1989) Molecular characterization of a functional cDNA for rat substance P receptor. *J Biol. Chem.*, **264**, 17649-17652.

Zhu,P.C., Thureson-Klein,A. & Klein,R.L. (1986) Exocytosis from large dense cored vesicles outside the active synaptic zones of terminals within the trigeminal subnucleus caudalis: a possible mechanism for neuropeptide release. *Neuroscience*, 19, 43-54.

7.2. Az értekezéshez felhasznált saját közlemények

- 1. P. Szucs, E. Polgar, I. Spiegelman, R. Porszasz and I. Nagy: Neurokinin 1 receptor expression on young rat dorsal root ganglion neurons. *J. Periph. Nerv. Sys.*, 4: 270-278, 1999. [IF:1.038]
- E. Polgar, P. Szucs, L. Urban, K. Matesz and I. Nagy: Immunohistochemical localization of neurokinin-1 receptor in the lumbar spinal cord of young rats: morphology and distribution. *Somatosensory & Motor Research*, 16(4): 361-368, 1999. [IF: 0.931]
- 3. **P. Szucs**, F. Odeh, K. Szokol and M. Antal: Neurons with distinctive firing patterns, morphology and distribution in laminae V-VII of the neonatal rat lumbar spinal cord. *Eur. J. Neurosci.*, **17**, 537-544, 2003. [IF: 3.919]

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kísérletekek a DEOEC Anatómia, Szövet- és Fejlődéstani Intézetében és a strasbourgi Louis Pasteur egyetem UMR 7519 számú laboratóriumában végeztem.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Antal Miklós intézetigazgatónak amiért lehetővé tette, hogy az intézetben dolgozhassak.

Köszönettel tartozom továbbá Dr. Nagy Istvánnak, korábbi témavezetőmnek aki még egyetemi éveim alatt tudományos diákköri munkám irányításával erősítette meg bennem az elhatározást, hogy a kutatómunkát válasszam. Magas színtű elméleti és gyakorlati tudásának, valamint mindenkori támogató magatartásának nagyon sokat köszönhetek szakmailag és emberileg egyaránt.

Köszönet illeti az intézet minden egykori és jelenlegi munkatársát akik tanácsaikkal segítették munkámat az intézetben. Külön köszönet illeti Dr. Matesz Klárát, Dr. Polgár Erikát, Dr. Francis Odeh-t, Szokol Karolinát, Bakk Erzsébetet támogatásukért és barátságukért.

Ugyanekkora hálával tartozom Somogyi Péternek, Gianmaria Maccaferrinek, Naoki Kogo-nak Oxfordból és Dr. Pierrick Poisbeau-nak Strasbourgból, akiktől a morfológiai és patch-clamp technikákon túl a tudomány szeretetét és olyan szemléletmódot tanultam, ami további munkám során remélhetőleg végig fog kisérni.

Köszönet illeti összes szerzőtársamat akik a közleményeinkben bemutatott munkákban segítségemre voltak és amiért elfogadták az én szerény hozzájárulásomat.

Nem utolsó sorban köszönet illeti családomat: szüleimet, testvéremet és feleségemet amiért támogattak, lehetővé tették és elviselték tanulmányaimat, munkámat és a sokszor ezzel járó elkerülhetetlen nehézségeket.

72
9. FÜGGELÉK

Egyéb közlemények

- A. Kulik, E. Polgar, C. Matesz, P. Szucs, S. Kothalawala and I. Nagy: Subpopulation of capsaicin sensitive primary afferent neurons in thoracic, lumbar, and sacral dorsal root ganglion in young rats revealed by stimulated cobalt uptake. *Acta Biol. Hung.*, 47 (1-4): 385-394, 1996. [IF: 0.291]
- I. Nagy, J. Croxford, E. Polgar, P. Szucs, A. Dray and L. Urban: GAP-43 immunoreactivity is enhanced after UV irradiation in the peripheral nervous system of the rat. *Primary Sensory Neuron*, 2:43-63, 1997. [IF:-]
- 3. E. Polgar, **P. Szucs**, L. Urban and I. Nagy: Substance P immunoreactivity in rat spinal dorsal horn after ultra violet irradiation induced hind paw inflammation. *Brain Res.*, **786**: 248-251, 1998. [IF: 2.526]
- 4. G. Maccaferri, J. D. B. Roberts, **P. Szucs**, C. A. Cottingham, P. Somogyi: Cell surface domain specific postsynaptic currents evoked by identified GABAergic neurones in rat hippocampus *in vitro*. *J. Physiol.*, **524:** 91-116, 2000. [IF: 4.45]
- P. Ganter, P. Szűcs, O. Paulsen and P. Somogyi: Properties of horizontal axoaxonic cells in stratum oriens of the hippocampal CA1 area of rats *in vitro*. *Hippocampus*, 2003 (in press) [IF: 4.33]
- 6. I. V. Melnick, S. Santos, P. Szűcs and B. V. Safronov: Ionic basis of tonic firing in spinal substantia gelatinosa neurons of rat. *J Neurophysiol*, 2003 (submitted).

Előadások, absztraktok

- P. Szucs, E. Polgar, I. Nagy: Activation of dorsal root ganglion cells with Substance P. Worldwide Hungarian Medical Academy, Pécs, Hungary, July 4-6, 1996.
- 2. **P. Szucs**, E. Polgar, I. Nagy: NK1 receptor expression in dorsal root ganglion cells of young rats. MAT'IX., Szeged, Hungary, April 4-6, 1997.
- P. Szucs, E. Polgar, L. Urban, S. Jeftinija and I. Nagy: Spinal cord neurons in which interaction between N-methyl-D-aspartate and neurokinin-1 receptors may occur. *Soc. Neurosci.* 156.5 (1995).
- I. Nagy, E. Polgar, P. Szucs, L. Urban and J.N. Wood Plastic changes in neurokinin-1 receptor expression of spinal cord neurons in inflammatory hyperalgesia. *Soc. Neurosci.* 44.7 (1995).
- I. Nagy, E. Polgar, P. Szucs, A. Matisz and L. Urban: Neurokinin 1 receptor expression by dorsal root ganglion neurons in young rats. *IASP Publications*, Congress Abstracts, 121 (1996).
- P. Szucs, E. Polgar and I. Nagy: Spinal cord neurons in which interaction between N-methyl-D-aspartate and neurokinin-1 receptors may occur. *Neurobiology*, 4 (1996) 281-282.

- 7. **P. Szucs**, E. Polgar, I. Spiegelman, R. Porszasz, I. Nagy: Dorsal root ganglion cells expressing the NK1 receptor in young rats. *Neurobiology*, 5 (1997).
- E. Polgar, P. Szucs, K. Matesz, L.A. Campbell, L. Urban and I. Nagy: Locally injected nerve growth factor increases substance P synthesis in dorsal root ganglion neurons in all segments. *European Neuropeptide Club, Abstracts*, P10 (1997)
- P. Somogyi, P. Ganter, N. Kogo, G.M. Maccaferri, C. Paspalas, O. Paulsen, J.D. Roberts, R. Shigemoto, P. Szucs: Compartmentalisation and properties of synapses and receptors in a feedback circuit of the cerebral cortex. *J. Physiol.* (1999), 518P, pp. 22S Proceedings of the scientific meeting held at UCL, 20-22 April, 1999
- P. Szucs, F. Odeh, K. Szokol and M. Antal: Electrophysiological and morphological characteristics of neurons in the intermediate gray matter (laminae V-VII) of the neonatal rat lumbar spinal cord *in vitro*. IBRO CEER, Neurobiology (*in press*, 2002)
- 11. **P. Szucs**, F. Odeh, K. Szokol, M. Antal: Electrophysiological and morphological characteristics of neurones in the intermediate gray matter (laminae V-VII) of the neonatal rat lumbar spinal cord in vitro. FENS, July 2002, Paris.
- P. Szucs, M. Antal, K. Szokol, F. Odeh, P. Poisbeau: Modulation of neuronal excitability by substance-P in laminae V-VII of the neonatal rat lumbar spinal cord. MITT, January 2003, Balatonfured, HUNGARY