

# **DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Kókai Éva**

**Patkány gerincvelői hátsó szarv felületes lamináiban  
található neuronok lokális kapcsolatrendszerének feltárása  
axon elágazódási mintázataik elemzésén keresztül**

**DEBRECENI EGYETEM**

**MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2024**

# **DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Patkány gerincvelői hátsó szarv felületes lamináiban található  
neuronok lokális kapcsolatrendszerének feltárása axon  
elágazódási mintázataik elemzésén keresztül**

**Kókai Éva**

**Témavezető: Dr. Szücs Péter**



**DEBRECENI EGYETEM**

**MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2024**

# 1 TARTALOM

|          |                                                                                                                                                     |           |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>2</b> | <b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>                                                                                                                   | <b>3</b>  |
| <b>3</b> | <b>BEVEZETÉS.....</b>                                                                                                                               | <b>5</b>  |
| <b>4</b> | <b>IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....</b>                                                                                                                     | <b>6</b>  |
| 4.1      | A FÁJDALOMINFORMÁCIÓ KÖZPONTI IDEGRENDSZERI FELDOLGOZÁSA .....                                                                                      | 6         |
| 4.2      | A GERINCVELŐ FELÉPÍTÉSE, A FELSZÍNES LAMINÁK JELENTŐSÉGE .....                                                                                      | 7         |
| 4.2.1    | Primer afferensek .....                                                                                                                             | 9         |
| 4.2.2    | A hátsó szarvi laminák neuronjainak morfológiai és elektrofiziológiai karakterizálása .....                                                         | 11        |
| 4.2.2.1  | I-es lamina - marginalis zóna.....                                                                                                                  | 11        |
| 4.2.2.2  | II-es lamina.....                                                                                                                                   | 12        |
| 4.2.2.3  | III-IV-es lamina.....                                                                                                                               | 13        |
| 4.2.2.4  | V-VI-os lamina.....                                                                                                                                 | 14        |
| 4.2.3    | A hátsó szarvi idegsejtek neurokémiai karakterizálásának rövid áttekintése.....                                                                     | 14        |
| 4.2.3.1  | NK1 receptorral rendelkező sejtek eloszlása a hátsó szarvban .....                                                                                  | 15        |
| 4.3      | FELTÉTELEZETT NEURONHÁLÓZATOK A GERINCVELŐ HÁTSÓ SZARVÁBAN .....                                                                                    | 15        |
| 4.4      | ISMERT AXONELÁGAZÓDÁSI MINTÁZATOK A GERINCVELŐ LUMBALIS SZAKASZÁNAK FELSZÍNES LAMINÁIBAN .....                                                      | 17        |
| <b>5</b> | <b>CÉLKITŰZÉS.....</b>                                                                                                                              | <b>19</b> |
| <b>6</b> | <b>ANYAG ÉS MÓDSZER.....</b>                                                                                                                        | <b>20</b> |
| 6.1      | GERINCVELŐI BLOKKOKBAN- ÉS SZELETPREPARÁTUMOKON VÉGZETT IN VITRO ELEKTROFIZIOLÓGIAI KÍSÉRLETEK RÖVID ÁTTEKINTÉSE .....                              | 21        |
| 6.2      | SZÖVETANI FELDOLGOZÁS .....                                                                                                                         | 22        |
| 6.3      | A SEJTREKONSTRUKCIÓK MENETE.....                                                                                                                    | 23        |
| 6.4      | KVANTITATÍV MORFOLÓGIAI ELEMZÉSEK .....                                                                                                             | 25        |
| 6.4.1    | Interlamináris megoszlás elemzése .....                                                                                                             | 26        |
| 6.4.2    | Sejtszimmetria elemzése .....                                                                                                                       | 27        |
| 6.4.3    | Statisztikai elemzés.....                                                                                                                           | 28        |
| <b>7</b> | <b>EREDMÉNYEK.....</b>                                                                                                                              | <b>29</b> |
| 7.1      | I-ES LAMINA SEJTEK .....                                                                                                                            | 29        |
| 7.1.1    | Projekciós neuronok.....                                                                                                                            | 29        |
| 7.1.1.1  | Interlamináris megoszlás .....                                                                                                                      | 31        |
| 7.1.1.2  | Sejtszimmetria .....                                                                                                                                | 33        |
| 7.1.2    | Interneuronok.....                                                                                                                                  | 37        |
| 7.1.2.1  | Interlamináris megoszlás .....                                                                                                                      | 38        |
| 7.1.2.2  | Sejtszimmetria .....                                                                                                                                | 40        |
| 7.2      | III-AS LAMINA SEJTEK .....                                                                                                                          | 43        |
| 7.2.1    | Antenna sejtek .....                                                                                                                                | 43        |
| 7.2.1.1  | Interlamináris megoszlás .....                                                                                                                      | 44        |
| 7.2.1.2  | Sejtszimmetria .....                                                                                                                                | 46        |
| 7.3      | A VIZSGÁLT SEJTCSOPORTOK (PN, IN, ANT) ÖSSZEHASONLÍTÓ ELEMZÉSE .....                                                                                | 49        |
| <b>8</b> | <b>MEGBESZÉLÉS .....</b>                                                                                                                            | <b>53</b> |
| 8.1      | TECHNIKAI MEGFONTOLÁSOK .....                                                                                                                       | 55        |
| 8.2      | PROJEKCIÓS NEURONOK .....                                                                                                                           | 57        |
| 8.2.1    | Contralateralisan megjelenő axonkollaterálisok .....                                                                                                | 57        |
| 8.2.2    | A ventralis PN kollaterálisok aktiválhatják a mélyebb laminákban található hátsó szarvi neuronokat (Kiegészítő elektrofiziológiai kísérletek) ..... | 58        |

|       |                                                                                                                                                        |    |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 8.2.3 | <i>A PN-ok V-VII-es laminába küldött kollaterálisainak serkentő hatása közreműködhet a nociceptív flexor reflex kialakításában</i> .....               | 60 |
| 8.3   | INTERNEURONOK .....                                                                                                                                    | 61 |
| 8.3.1 | <i>Dendrit- és axonmegoszlási mintázat és funkcionális aszimmetria a gerincvelő hátsó szarvának felszínes lamináiban</i> .....                         | 61 |
| 8.4   | ANTENNA SEJTEK .....                                                                                                                                   | 64 |
| 8.4.1 | <i>Morfológiából adódó sajátosságok</i> .....                                                                                                          | 64 |
| 8.4.2 | <i>Az antenna sejtek axoneloszlása nem mutat egyértelmű korrelációt primer afferens bemeneteikkel (Kiegészítő elektrofiziológiai kísérletek)</i> ..... | 65 |
| 9     | <b>ÖSSZEFOGLALÁS</b> .....                                                                                                                             | 68 |
| 10    | <b>SUMMARY</b> .....                                                                                                                                   | 69 |
| 11    | <b>IRODALOMJEGYZÉK</b> .....                                                                                                                           | 70 |
| 12    | <b>KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE</b> .....                                                                                                                      | 87 |
| 13    | <b>TÁRGYSZAVAK/ KEY WORDS</b> .....                                                                                                                    | 90 |
| 14    | <b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b> .....                                                                                                                       | 91 |
| 15    | <b>FÜGGELÉK</b> .....                                                                                                                                  | 92 |

## 2 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

|                                   |                                       |                                                        |
|-----------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| <b>3D</b>                         | 3-dimenzió                            |                                                        |
| <b>ACSF</b>                       | arteficialis agy-gerincvelői folyadék | <i>arteficial cerebrospinal fluid</i>                  |
| <b>ALT</b>                        | anterolateralis traktus               |                                                        |
| <b>ANT</b>                        | antenna sejt                          |                                                        |
| <b>AP</b>                         | akciós potenciál                      |                                                        |
| <b>BDA</b>                        | biotinilált dextrán amin              |                                                        |
| <b>C</b>                          | caudalis                              |                                                        |
| <b>Cx</b>                         | cervicalis<br>(x=1-8 szegmentum)      |                                                        |
| <b>CL</b>                         | caudolateralis                        |                                                        |
| <b>CM</b>                         | caudomedialis                         |                                                        |
| <b>cSzÁ</b>                       | contralateralis szürkeállomány        |                                                        |
| <b>DAB</b>                        | 3,3'-diaminobenzidin                  |                                                        |
| <b>DF</b>                         | funiculus dorsalis                    | <i>dorsal funiculus</i>                                |
| <b>DIC</b>                        | differenciál interferencia kontraszt  | <i>differential interference contrast</i>              |
| <b>DLF</b>                        | funiculus dorsolateralis              | <i>dorsolateral funiculus</i>                          |
| <b>EPSP</b>                       | serkentő posztszinaptikus potenciál   | <i>excitatory postsynaptic potential</i>               |
| <b>GABA</b>                       | $\gamma$ -aminovajsav                 | <i><math>\gamma</math>-aminobutyric acid</i>           |
| <b>GV</b>                         | gerincvelő                            |                                                        |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | hidrogén-peroxid                      |                                                        |
| <b>HRP</b>                        | tormaperoxidáz                        | <i>horseradish peroxidase</i>                          |
| <b>HT</b>                         | magas küszöbű                         | <i>high-threshold</i>                                  |
| <b>IASP</b>                       | Nemzetközi Fájdalomkutató Szövetség   | <i>International Association for the Study of Pain</i> |
| <b>IN</b>                         | interneuron                           |                                                        |
| <b>IPSI</b>                       | ipsilateralis (oldal)                 |                                                        |
| <b>IR-LED</b>                     | infravörös fényt kibocsátó dióda      | <i>infra red light-emitting diode</i>                  |
| <b>Isl</b>                        | islet sejt                            |                                                        |
| <b>L</b>                          | lateralis                             |                                                        |
| <b>Lx</b>                         | lumbalis x<br>(x=1-6 szegmentum)      |                                                        |
| <b>LF</b>                         | funiculus lateralis                   | <i>lateral funiculus</i>                               |
| <b>LI-X</b>                       | I-X-es lamina                         |                                                        |
| <b>LI<sub>ii</sub></b>            | II-es lamina belső része              | <i>lamina II inner</i>                                 |
| <b>LI<sub>io</sub></b>            | II-es lamina külső része              | <i>lamina II outer</i>                                 |
| <b>LT</b>                         | alacsony küszöbű                      | <i>low-threshold</i>                                   |
| <b>LTMR</b>                       | alacsony küszöbű mechanoreceptorok    | <i>low-threshold mechanoreceptor</i>                   |
| <b>M</b>                          | medialis                              |                                                        |
| <b>ML</b>                         | mediolateralis                        |                                                        |
| <b>Mrgprd</b>                     | Mas-proteinhez kapcsolt D receptortag | <i>Mas-related G-protein coupled receptor member D</i> |
| <b>Na<sup>+</sup></b>             | nátrium                               |                                                        |
| <b>NK1R</b>                       | neurokinin-1 receptor                 |                                                        |
| <b>nNOS</b>                       | neuronális nitrogén-monoxid szintáz   |                                                        |
| <b>n.s.</b>                       | nem szignifikáns                      |                                                        |

|              |                                                                           |                                                                                      |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>PB</b>    | foszfát puffer                                                            | <i>phosphate buffer</i>                                                              |
| <b>PN</b>    | projekciós neuron                                                         |                                                                                      |
| <b>R</b>     | rostralis                                                                 |                                                                                      |
| <b>RC</b>    | rostrocaudalis                                                            |                                                                                      |
| <b>RL</b>    | rostrolateralis                                                           |                                                                                      |
| <b>RM</b>    | rostromedialis                                                            |                                                                                      |
| <b>Sx</b>    | sacralis<br>(x= 1-4 szegmentum)                                           |                                                                                      |
| <b>SEM</b>   | átlag szórása                                                             | <i>standard error of the mean</i>                                                    |
| <b>SP</b>    | P anyag                                                                   | <i>Substance P</i>                                                                   |
| <b>szim</b>  | szimmetriatengely                                                         |                                                                                      |
| <b>Tx</b>    | thoracalis<br>(x= 1-13 szegmentum)                                        |                                                                                      |
| <b>TB</b>    | Tris- foszfát puffer                                                      |                                                                                      |
| <b>TBS</b>   | sós- Tris- foszfát puffer                                                 |                                                                                      |
| <b>ToC</b>   | tónusosan tüzelő központi sejt                                            | <i>tonic central cell</i>                                                            |
| <b>TrC</b>   | átmeneti akciós potenciál tüzelésű                                        | <i>transient mode of action potential discharge</i>                                  |
| <b>TrkA</b>  | tropomyosin receptor kinase A                                             |                                                                                      |
| <b>TRPM8</b> | transziens receptorpotenciál<br>kationcsatorna M alcsaládjának 8-as tagja | <i>transient receptor potential cation channel subfamily M (melastatin) member 8</i> |
| <b>TRPV1</b> | transziens receptor potenciál vanilloid 1                                 |                                                                                      |
| <b>TTX</b>   | tetrodotoxin                                                              |                                                                                      |
| <b>V</b>     | verticalis sejt                                                           |                                                                                      |
| <b>VF</b>    | funiculus ventralis                                                       | <i>ventral funiculus</i>                                                             |
| <b>VGLUT</b> | vezikuláris glutamate transzporter                                        |                                                                                      |
| <b>WDR</b>   | széles dinamika-tartomány                                                 | <i>wilde dynamic range</i>                                                           |

### 3 BEVEZETÉS

---

Annak ellenére, hogy a gerincvelő a központi idegrendszernek egy viszonylag egyszerűbb felépítésű területe, meglepően keveset tudunk idegsejtjeinek felépítéséről és az általuk kialakított kapcsolatairól (Todd 2010). A rendelkezésre álló adatok túlnyomórészt rágcsálók, macskák és majmokból származó gerincvelői neuronok szomatodendritikus sajátságaira, elektrofiziológiai jellemzőire, illetve a neuronok neurokémiai markereire vonatkoznak. A neuronális működés szempontjából azonban a szomatodendritikus területek a neuronok receptív részét képezik, míg hálózati szempontból legalább ilyen jelentős kimenetük az axonjuk, amelyről a felületes laminákban található idegsejtek esetében elenyésző ismeretekkel rendelkezünk. Az elmúlt évtizedben a központi idegrendszer más területein rutinszerűvé vált túlélő agyszeletpreparátumok alkalmazásával a gerincvelői hátsó szarv területén is megtörtént bizonyos sejtípusok kapcsolatrendszerének vizsgálata (Gradwell és mtsai. 2022; Häring és mtsai. 2018; Huang és mtsai. 2018; Polgár és mtsai. 2023; Quillet és mtsai. 2023; Varga és mtsai. 2021). A substantia gelatinosa egyes gátló sejtjei (Yasaka és mtsai. 2010), a III-as lamina cholinerg sejtjei (Mesnage és mtsai. 2011), illetve az I-es lamina projekciós (Szücs és mtsai. 2010) és interneuronjainak (Szücs és mtsai. 2013) esetében születtek az axon részletes leírását célzó közlemények. Ezidáig azonban a gerincvelői idegsejtek individuális axonjainak morfológiai elemzését, laminák szerinti eloszlását és lehetséges célpontjainak kvantitatív analízisét szisztematikusan, legjobb tudomásunk szerint, egyetlen kutatócsoport sem végezte el.

A neuronális kapcsolatok ismerete ugyanakkor a központi idegrendszer más területein számos alapvető idegrendszeri folyamat leírását, illetve különböző idegrendszeri megbetegedések pathomechanizmusának megértését tette lehetővé. Ezek alapján elmondható, hogy a fájdalom lehető leghatékonyabb, illetve a fájdalom típusának legmegfelelőbb csillapításához ugyanígy elengedhetetlen lenne a fájdalominformáció feldolgozását első vonalban végző hátsó szarvi neuronok pontos kapcsolatrendszerének ismerete.

A közelmúltban a ferde infravörös LED (IR-LED- *InfraRed-Light-Emitting Diode*) megvilágítási technika segítségével lehetővé vált a gerincvelő felszínes lamináiban található, in vivo kísérletekben nehezen tanulmányozható neuronok in vitro körülmények között történő vizsgálata (Szücs és mtsai. 2009). Ez a technika nemcsak az eddig nehezen tanulmányozható neuronok célzott jelöléséhez járult hozzá, hanem a sejtek morfológiáját is megőrzi, ezáltal lehetővé teszi azok lokális axonelágazódási mintázatának, kapcsolatrendszerének vizsgálatát.

## 4 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

---

### 4.1 A FÁJDALOMINFORMÁCIÓ KÖZPONTI IDEGRENDSZERI FELDOLGOZÁSA

*A fájdalom pontos definiálásának egyik legnehezebb aspektusa, hogy mindenki érzett már fájdalmat, viszont annak intenzitása, hossza számos tényezőtől függ, még egyénen belül is. A hivatalos Nemzetközi Fájdalomkutató Szövetség (IASP-International Association for the Study of Pain) 2011-es definíciója szerint a fájdalom egy „kellemetlen szenzoros és emocionális élmény, amely tényleges vagy potenciális szövetkárosodással kapcsolatos vagy ahhoz hasonló.”*

*A fájdalom megértésére már évezredek óta törekszik az emberiség, hiszen annak megélése alapvető. Kezdetekben elterjedt nézet volt, hogy a fájdalom egyfajta kommunikáció a természetfeletti erők és az emberek között. Egyes források szerint az ókori görögök szentül hitték, hogy magukra haragították az isteneket, akik leküldték Nemezis, a megtorlás istennőjének a kísértőjét, Poine-t (ide vezethető vissza a fájdalom és a megtorlás latin szava a poane), hogy fájdalommal büntesse meg őket az elkövetett bűneikért. Később, a kereszténység korában már úgy tekintettek a fájdalomra, mint a megtisztulás módjára, az Istenhez vezető útra (Hamann 2021; Khan és mtsai. 2015).*

*Az évszázadok folyamán ezek az elképzelések a kor szellemével, tapasztalati úton szerzett ismeretekkel és az anatómiai tudás bővülésével módosultak és a reneszánsz idejére (XIV-XVII. század) Descartes, Willis és Sydenham munkásságában már az agy került előtérbe, mint a fájdalom feldolgozásának helye (a korábban vélt szív helyett). Ezzel pedig megindult egy idegtudományi „forradalom” a fájdalom hátterének megismerésére (Chen 2011; Perl 2007).*

Normál (és patológiás) körülmények között a fájdalmas és fájdalommentes stimulusok egy nagyon komplex rendszeren keresztül kerülnek feldolgozásra (Latréolière 2016). A fájdalomhoz asszociált útvonal egy fájdalmas ingerrel kezdődik, ami lehet mechanikai, thermalis, kémiai, gyulladásos vagy szöveti károsodáshoz társuló. Ezek a káros ingerek általában az ún. nociceptorok szabad idegvégződésein keresztül továbbítódnak, amik különböző szövetekben, mint kötőszövetben, perifériás arteriolákban vagy a bőrben fordulnak elő. A nociceptorok (más néven primer afferens neuronok) pseudo-unipoláris idegsejtek, amiknek perifériás axonjuk a sérülés helyén, a sejttestjük a hátsógyöki ganglionban találhatóak a hátsó gyökök mentén, míg a központi axonjuk a gerincvelő hátsó szarvába vetül (Millan 1999; Todd és Wang 2018).

A gerincvelő hátsó szarvában a projekciós neuronok képezik a fő kimenetet az agyba. Ezek a neuronok az alapjai több felszálló pályának, beleértve a spinothalamicus és spinoreticulothalamicus pályákat, amik a fájdalominformációt szállítják a thalamusba és az agytörzsbe. A thalamusból további neuronok továbbítják a fájdalmas ingert az agykéregbe, ahol lehetővé teszik a fájdalomérzet észlelését (Bourne és mtsai. 2014; Fonyó 2014; Rajneesh és Bolash 2018; Basbaum és mtsai. 2009).

A fájdalomérzékelés modulálása a fájdalom pályák különböző állomásain eltérő mechanizmusokkal történik, beleértve a hátsógyöki gangliont, a gerincvelő hátsó szarvát, az agytörzs retikularis rendszerét és az agykérgi területeket. Ezek a folyamatok szolgálnak arra, hogy a fájdalmas impulzust megváltoztassák, mielőtt eléri az agykérget (Rajneesh és Bolash 2018).

Ugyanilyen fontosságúak a fájdalomérzékelésben az agyi struktúrák irányából induló leszálló pályák a gerincvelőbe. Ezen pályák gerincvelőben kifejtett moduláló hatása a primer afferens bemenetek terminálisain, projekciós, serkentő és gátló interneuronokon, illetve egyéb leszálló pálya terminálisán bekövetkező interakción keresztül egyaránt megtörténhet (Millan 2002).

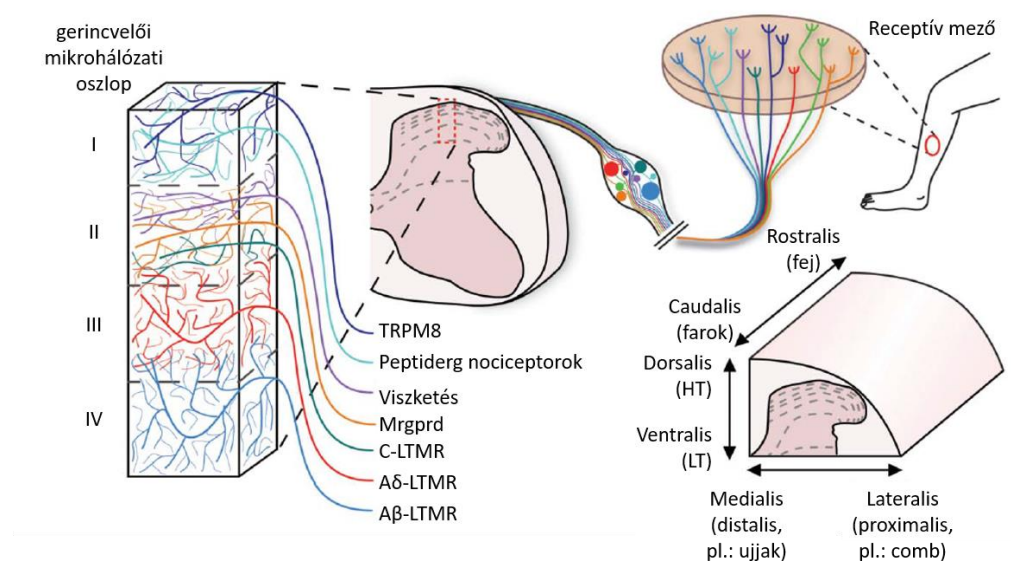
## **4.2 A GERINCVELŐ FELÉPÍTÉSE, A FELSZÍNES LAMINÁK JELENTŐSÉGE**

A gerincvelő (gv), azon belül a hátsó szarvi szürkeállomány laminái az a terület, ahol a külvilágból érkező fájdalmas ingerek elérik a központi idegrendszert, valamint ahol a szenzoros információ elsőként integrálódik (Brown 1982). A hengeres megjelenésű gerincvelőt különböző szegmensekre oszthatjuk a következők szerint: cervicalis (C), thoracalis (T), lumbalis (L), sacralis (S) és coccygealis (Ross 2007; Watson és mtsai. 2009).

Keresztmetszeti képe makroszkóposan 2 területre osztható: a belső szürkeárnyalatú H betűt formázó, a canalis centralist közre fogó területe a szürkeállomány, ami idegsejtek sejttestjeit, nyúlványhálózatát és gliasejteket tartalmaz, a külső fehérállományt pedig a fel- és leszálló, valamint propriospinalis pályákat alkotó, myelinizált és nem-myelinizált axonok alkotják. A szürkeállomány teljes rostrocaudalis hosszában meglévő elülső és hátsó kitüremkedéseket mellső-, illetve hátsó szarvnak hívjuk, míg a thoracolumbalis szegmentumok magasságában ezekhez egy oldalirányú kitüremkedés az ún. oldalsó szarv is csatlakozik. A mellső szarv jellegzetes sejtjei a nagyméretű motoneuronok, a hátsó szarv pedig változatos méretű dominánsan multipolaris, a szenzoros információk kezdeti feldolgozásában és

továbbításában részt vevő neuronokat tartalmazza (Ross 2007; Todd és Koerber 2006). A szürke- és fehérállomány megoszlási aránya jellegzetesen változik a gerincvelő teljes szakaszán (Molander és mtsai. 1989; Molander és mtsai. 1984; Watson és mtsai. 2009); a gerincvelő és a fehérállomány mérete legnagyobb az intumescentia cervicalis (C5-6) és lumbalis (L3-4) területén, mivel ide kapcsolódnak a felső- és alsó végtagok beidegzésében részt vevő plexusok (Saliani és mtsai. 2019).

A gerincvelő teljes szürkeállományát macskában Rexed (1952) 10, míg annak hátsó szarvát 6 párhuzamos rétegre, ún. laminákra osztotta az idegsejtek mérete és sűrűsége alapján. Ezt a sémát azóta már más fajokra is adaptálták, köztük emberre, majomra és patkányra. A hátsó szarv az a terület, amely elsősorban a szenzoros információk feldolgozásában vesz részt (Todd és Koerber 2006) egy komplex neuronális hálózat segítségével, ami helyi és propriospinalis interneuronokból, valamint supraspinalis célpontokhoz vetítő projekciós neuronokból áll (Todd 2010). Az információ ezekhez a neuronokhoz primer afferenseken keresztül érkezik a gerincvelőbe (1. ábra).



Smith és Ross 2020, módosított

1. ábra **Összefoglaló ábra a gerincvelőn belüli információfeldolgozásról (Smith és Ross 2020, módosított).** A primer afferens bemenetek belépve a hátsó szarvba egy ún. mikrohálózati oszlopot alkotnak (bal panel), amelyek egyetlen receptív mezőtől kapnak bemenetet (jobb felső). Dorsoventralisan intenzitás grádiens mentén szerveződnek: a fájdalmas és hőmérséklet-érzékeny rostok felületesen lépnek be (TRPM8- transziens receptorpotenciál kationcsatorna M alcsaládjának 8-as tagja, peptiderg nociceptorok és viszketés érzékeny afferensek), míg az alacsony küszöbű mechanoreceptorok (LTMR- low-threshold mechanoreceptor) mélyebben húzódnak a gerincvelő felületes lamináiban (bal). A gerincvelő rostrocaudalis és mediolateralis tengelyei mentén a primer afferensek testrégió szerint szerveződnek. A jobb alsó panelen a hátsó szarv különböző részei kerültek bemutatásra. HT; magas küszöbű- high-threshold, Mrgprd; Mas-proteinhez kapcsolt D receptortag -Mas-related G-protein coupled receptor member D, LT; alacsony küszöbű-low-threshold.

#### 4.2.1 Primer afferensek

A perifériáról érkező ingerek változó vezetési sebességgel váltanak ki érzetet a primer afferens rostok eltérő myelinizációjából adódóan. Ezek a rostok lehetnek myelinizáltak (A $\beta$ : 16-100 m/s, A $\delta$ : 5-30m/s), ami lehetővé teszi a gyors ingerületvezetést, vagy nem-myelinizáltak (C: 0,2-2 m/s) (Abraira és Ginty 2013; Perl 2013; Todd és Wang 2018). Elektrofiziológiai karakterük alapján is csoportosíthatjuk őket, mint alacsony küszöbű primer afferens, ami nem károsító, alacsony intenzitású ingereket továbbít és nem fájdalmas érzetet vált ki, továbbá mint magas küszöbű, aminek funkciója a nagy intenzitású, potenciálisan károsító ingerek továbbítása (Lawson 2002). Ez a klasszifikáció azonban nem képes precízen szétválasztani azokat a komplex funkciókat ellátó neuronokat, amik diverz stimulációt kódolnak, mint például a környezet hőmérsékletét, felületek textúráját, egy szellő irányát, stb. (Crawford és Caterina, 2020; 1. táblázat).

Az A rostok főként alacsony küszöbű mechanoreceptorokként (A-LTMR) vannak jelen, ezen felül azonban az A $\delta$ -rostok feltételezhetően felelősek az akut, kis látenciájú szúró fájdalom érzékeléséért (Basbaum és mtsai. 2009) és az A $\beta$  némelyike is képes fájdalmas ingerre válaszolni (Djouhri és Lawson 2004).

A C rostok szenzoros modalitásuk alapján feloszthatóak tapintási ingereket feldolgozó alacsony küszöbű rostokra (C-LTMR, Seal és mtsai. 2009), valamint magas küszöbű rostokra, amik mechanikai és fájdalmas hő ingerre válaszolnak (Todd és Wang 2008). Ezeket a nocicepcióban részt vevő C rostokat feloszthatjuk továbbá neurokémiai modalitásuk alapján peptiderg és nem peptiderg csoportokra. A peptiderg C rostok (és a nocicepcióban részt vevő A $\delta$  rostok) neuropeptideket expresszálnak és calcitonin génhez kapcsolódó peptidet, P anyagot és galanint tartalmaznak. Ezek az afferensek kifejeznek tranziens receptor potenciál vanilloid 1-et (TRPV1), szerepük a hő okozta fájdalom érzékelésében van (Cavanaugh és mtsai. 2009). A C nociceptorok másik, nem peptiderg csoportja a mechanikai fájdalom normális érzékelésében vesz részt. Jellemzően Mrgpdr-t fejeznek ki, TRPV1-et azonban nem expresszálnak és neuropeptidekkel sem rendelkeznek (Cavanaugh és mtsai. 2009; Zylka és mtsai. 2005). Még 2 másik típusát írták le a C típusú rostoknak: a szomatosztatin és B-típusú natriuretikus polipeptidet ko-expresszálót, valamint a MrgA3/MrgC11 (Mas-proteinhez kapcsolt receptorcsalád 2 tagja) expresszálót. Mindkét típus a pruricepcióban vesz részt (Chen és Sun 2020; Han és mtsai. 2013; Huang és mtsai. 2018).

1. táblázat Összefoglaló a primer afferens bemenetekről (Crawford és Caterina, 2020., 2. táblázata alapján)

| <i>Primer afferens típusa</i> | <i>Jellemzői</i>                            | <i>Terminális helye</i> | <i>Szerepe</i>                              | <i>Markere</i>               |
|-------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------------|------------------------------|
| <i>Aβ</i>                     | gyorsan adaptálódó LTMR, I-es típus         | III-V-ös lamina         | gyenge, felszínes nyomás                    | NFH/NF200, prenatalisan TrkB |
|                               | gyorsan adaptálódó LTMR, II-es típus        | III-V-ös lamina         | nagy frekvenciájú vibráció, mély nyomás     | NFH/NF200                    |
|                               | lassan adaptálódó LTMR, I-es és II-es típus | III-V-ös lamina         | mechanikai allodynia (?)                    | NFH/NF200                    |
| <i>Aδ</i>                     | LTMR                                        | II-III-as lamina        | szellő, mechanikai allodynia (?)            | TrkB (egérben)               |
|                               | peptiderg nociceptor                        | I-es és V-ös lamina     | hajhúzás                                    | CGRP, TrkC                   |
|                               | peptiderg nociceptor (magas küszöbű)        | I-es és V-ös lamina     | fájdalmas tűszúrás, csípés                  | TrkA, CGRP, SP               |
| <i>C</i>                      | LTMR                                        | II-es lamina            | cirógatás, fuvallat érzése                  | VGLUT3                       |
|                               | peptiderg nociceptor                        | I-es lamina             | hőmérséklet, kapszaicin, thermalis fájdalom | TrkA, CGRP, SP               |
|                               | nem peptiderg nociceptor                    | II-es lamina            | fájdalmas szúrás, viszketés                 | IB4, Mrgpdr, MrgA3           |
| <i>Aδ és C</i>                | thermoreceptor                              | I-II-es lamina          | hidegérzet, mentol, hideg fájdalom          | TrpM8                        |

A különböző szenzoros modalitások feldolgozásához a primer afferensek központi terminálisai szigorú sorrendbe rendeződnek (Brown 1981; Fitzgerald 1989; Fyffe 1984; Ramón y Cajal 1909; Réthelyi 1984; Todd 2010; Abraira 2013). A vékony myelinizált A $\delta$  és a nem-myelinizált C afferensek elsődlegesen a felszínes laminákban (I-II-es lamina) végződnek, ami a fő nociceptív feldolgozó területe a gerincvelőnek (Todd 2006; Willis és Coggeshall 2004). A mélyebben elhelyezkedő III-as laminában (Ma és mtsai. 1996; Schneider 1992; Willis és Coggeshall 2004; Woolf és King 1989) végződnek a szőrszálakat beidegző A $\delta$  afferensek és az alacsony küszöbű mechanoreceptorként funkcionáló A $\beta$  afferensek is (Brown 1981; Réthelyi, Light és Perl 1982; Todd 2006).

Egyre több bizonyítékot találnak azonban arra, hogy ez a szegregáció nem jelenti a feldolgozó neuronhálózatok teljes elkülönülését. Az utóbbi években publikálásra kerültek olyan eredmények, ahol azt találták, hogy hátsó szarvi neuronok alacsony küszöbű mechanoreceptorokat kötnek össze nociceptív információt feldolgozó neuronokkal közvetlenül (Fernandes és mtsai. 2016; Luz és mtsai. 2014) vagy további, különböző típusú serkentő és gátló interneuronokon keresztül (Braz és mtsai. 2014; Duan és mtsai. 2014; Lu és mtsai. 2013; Petitjean és mtsai. 2015).

#### **4.2.2 A hátsó szarvi laminák neuronjainak morfológiai és elektrofiziológiai karakterizálása**

##### **4.2.2.1 I-es lamina - *marginalis* zóna**

Az I-es lamina egy finom peremet képez a gerincvelői szürkeállomány hátsó szarvának dorsalis szélé mentén. A hátsó szarv lateralis oldalánál enyhén elhajlik, a medialis oldal viszont határozottabban végződik a hátsó szarv dorsalis részének medialis végén, ahol gyakran látható myelinizált rostok belépése. A vékony lamina nem válik el élesen a fehérállománytól (Molander és mtsai. 1984). Korai leírásokban még a substantia gelatinosa felszínes rétegének tekintették (Ramón y Cajal 1909; Ranson 1913), de ma már elfogadott, hogy az I-es lamina egy különálló strukturális és funkcionális egység (Cervero és Iggo 1980), amin belül megkülönböztetünk projekciós, valamint interneuronokat. A projekciós neuronok főként az I-es és V-ös laminában helyezkednek el, de elszórtan megjelenhetnek a III-VI-os laminában is. A hátsó szarvi projekciós neuronok nagy többségének főaxonja kereszteződik a gerincvelő középvonalán és az ellenoldali fehérállományban jut el supraspinalis célpontjaihoz. Az I-es laminában ugyanakkor, hasonlóan a többi hátsó szarvi laminához, döntően interneuronok helyezkednek el. Ezekre a sejtekre az a jellemző, hogy axonjuk helyben marad, nem hagyja el a felszínes

laminákat (I-III), fenotípus alapján lehetnek serkentőek vagy gátlók (Peirs és mtsai. 2020; Todd 2010).

Megjelenésük alapján, az általánosan elfogadott osztályozási séma szerint 3 vagy 4 altípust különböztetünk meg: fusiformis, multipolaris, piramis alakú (Zhang és Craig 1997; Zhang, Han és Craig 1996) vagy fusiformis, multipolaris, piramis alakú, valamint ellaposodott (Lima 1998; Lima és Coimbra 1986; Yu és mtsai. 1999). Ezek az osztályozások azonban csak a szomatodendritikus sajátosságokat veszi figyelembe. Ennek legfőbb oka, hogy a legtöbb klasszikus jelölési technika (a korábban használt Golgi-módszer (Lima és Coimbra 1986) vagy a későbbi dextranokat használó retrograd jelölési technikák) nem alkalmasak az axonok részletes megjelölésére.

A fent ismertetett morfológiai jegyek és az elektrofiziológiai mérések során meghatározott akciós potenciál (AP) mintázatok között ugyanakkor sikerült bizonyos korrelációt igazolni. Az I-es lamina neuronjai depolarizációt kiváltó áraminjekciók hatására tónusosan (alacsonyabb frekvenciával, egyenletesen), fázisosan vagy adaptálódóan (a tüzelés során a frekvencia és az amplitúdó is csökken), késleltetett módon (az első AP az áraminjekció kezdetéhez képest késve jelenik meg), illetve egyetlen AP-val válaszolva (“single spike”) tüzelnek (Prescott és De Koninck 2002). A fusiformis neuronok tipikusan tónusos tüzelési mintázatot mutatnak, a piramis alakú sejtek fázisosat, a multipolaris sejtek pedig lehetnek késleltetettek vagy “single spike”-ot mutatóak is. Egyes tüzelési mintázatok továbbá úgy tűnik, hogy bizonyos funkciókhoz köthetők a hátsó szarvban. A tónusos és késleltetett tüzelési mintázatokkal rendelkező sejtek főként integrátorként vesznek részt a folyamatokban, míg a fázisos és “single spike” tüzelésű sejtek pedig inkább közvetítő szerepet töltenek be (Luz és mtsai. 2014; Melnick és mtsai. 2004; Peirs és mtsai. 2020).

#### **4.2.2.2 II-es lamina**

A II-es lamina (substantia gelatinosa) az I-es lamina alatt, ventralisan helyezkedik el. Toluidinkék háttérfestést követően 2 részre osztható: egy intenzívebben jelölődő külső részre (LIIo- *lamina II outer*), ahol a sejtek tömöttebben helyezkednek el, valamint egy belső részre (LIIi- *lamina II inner*), ahol kissé lazábban találhatóak a sejtek. Ez a lamina jellegzetesen kisméretű sejteket tartalmaz és viszonylag mentes a myelinizált rostoktól. A II-es lamina medialis részét dorsalis irányból belépő, vastag myelinhüvelyes, nagy vezetési sebességű axonok szelik át. Emiatt, különösen a lumbalis szegumentumokban, a II-es lamina medialis oldala vastagabbnak tűnik (Molander és mtsai. 1984; Willis és Coggeshall 1978).

Perl kollaborációs partnereivel számos faj (többek között patkány) gerincvelői metszetében végzett intracellularis méréseket és sejtjelölést, amely kísérletek megalapozták a máig is használt klasszifikációs csoportokat (Grudt és Perl 2002; Lu és Perl 2003, 2005). A II-es laminában 5 főbb sejtípust határoztak meg: islet, centralis, radialis, medialis-lateralis és verticalis. Az itt található neuronok dendritfája jellegzetesen rostrocaudalis kiterjedésű, mediolateralisan és dorsoventralisan - a verticalis neuronok kivételével - inkább lapított (Ribeiro-Da-Silva 2015). Tüzelési mintázatuk tekintetében hasonlóak az I-es lamina neuronjaihoz (tónusos, fázisos, késleltetett, „single spike”), de ebben a laminában előfordulnak további tüzelési mintázatok is. Az ún. „gap” tüzelési mintázat esetén valamely két AP (jellemzően a sorozat elején) között a késés 1,5-szerese a két megelőző vagy azt követő 2 AP közötti késésnek. Egy másik kategória a „reluctant” (magyar megfelelője talán a „vonakodó” lehetne) tüzelési mintázat, amely típusnál a sejtek igen kifejezett depolarizáció hatására sem produkálnak AP-t (Peirs és mtsai. 2020). Yasaka (2010) munkacsoportjával azt találta, hogy a legtöbb (bár nem az összes) II-es lamina serkentő sejt késleltetett, „gap” vagy „reluctant” tüzelési mintázatot mutat.

#### **4.2.2.3 III-IV-es lamina**

A III-as laminában sűrűn, csoportosulva helyezkednek el a kis méretű sejtek, emiatt a II-es és III-as lamina határa nem egyértelműen felismerhető. Ebben a laminában ugyanakkor már láthatóak myelinizált rostok, ami segíti az elkülönítést. A III-as lamina lateralis szélé követi az I-II-es lamina görbületét, de emellett medialisán is mutathat kismértékű elhajlást. Dorsoventralisan területe a középvonalnál nagyobb, mint a két szélső oldalán. Ehhez képest a IV-es lamina szétszórtan tartalmaz közepes és nagyobb, morfológiailag heterogén sejteket. Medialis határa követi a hátsó szarv alakját, viszont a korábban az I-III-as laminában ismertetett lateralis elgörbülés nem jellemző erre a területre (Molander és mtsai. 1984; Schoenen és Faull 2004).

Ezek a laminák már a hátsó szarv kevésbé vizsgált területeihez tartoznak (Merighi 2018). Az egyik jobban tanulmányozott sejtípus a nagy méretű antenna sejt (ANT), amely piramis alakú sejttestje a III-IV-es laminában foglal helyet. Egyes NK-1 receptort (NK1R) expresszáló antenna sejtek az agytörzs és a thalamus nociceptív területein végződnek (Marshall és mtsai. 1996; Naim és mtsai. 1997; Todd, McGill és Shehab 2000), vannak azonban olyan antenna sejtek is, amik supraspinalisan nem projíciálnak és intrinsic vagy propriospinalis neuronokként működnek (Polgár és mtsai. 2007). Mindkét típusú antenna sejt rendelkezik egy dorsalis

dendrittel, ami keresztülnyúlik a II-es laminán, majd intenzíven elágazik az I-es laminában, míg a ventralis dendritjeik a mélyebb laminák irányába terjeszkednek (Bleazard és mtsai. 1994; Littlewood és mtsai. 1995; Maxwell és mtsai. 2007; Todd 1989). Ez a morfológiai adottság lehetővé teszi, hogy többféle, különböző szenzoros modalitásokhoz tartozó primer afferens bemenetet integráljon. Immunhisztokémiai vizsgálatok igazolták, hogy a dorsalis dendritek nagyszámú peptiderg és nem-peptiderg vékony primer afferens kapcsolatot fogadnak, vastag myelinizált primer afferensekkel azonban sokkal ritkábban kapcsolódnak (Naim és mtsai. 1997; Naim, Shehab és Todd 1998; Polgár és mtsai. 2007; Todd 1989, 2002). Kimutatták továbbá, hogy emellett helyi interneuronok axonjai is adnak rájuk szinapszisokat (Polgár és mtsai. 1999; Todd 1989), ami arra utalhat, hogy ingerlékenységüket a gerincvelői hálózat szabályozhatja. Bár ezen sejtek elektrofiziológiai sajátosságairól jelenleg még kevés információ áll rendelkezésre, úgy tűnik azonban, hogy széles dinamika-tartományú (WDR- *wide dynamic range*) vagy gyenge mechanikai stimulációra, esetleg egy közvetlen elektromos stimulációra reagáló neuroncsoport lehet (De Koninck és mtsai. 1992; Ma és mtsai. 1996; Maxwell és mtsai. 2007; Schneider 1992).

#### **4.2.2.4 V-VI-os lamina**

A hátsó szarv tövéénél kezdődő V-ös lamina sejtjei heterogének és megjelenésükben nagyobbak a IV-es laminában találhatóaknál, dendritjeikkel dorsalisán elérhetnek a II-III-as laminába, míg ventralisan a VII-es laminába is (Molander és mtsai. 1984; Schoenen és Faull 2004). A VI-os lamina a hátsó szarv legventralisabb területe, azonban nem minden szegmensben található meg (T6-L2, S2-4) (Molander és mtsai. 1984). Sejtjei kisebbek és jobban rendezettek, mint az V-ös laminában található sejtek (Peirs és mtsai. 2020), interneuronjai a gerincvelői reflexek kialakításában vesznek részt (Heise és Kayalioglu 2009).

#### **4.2.3 A hátsó szarvi idegsejtek neurokémiai karakterizálásának rövid áttekintése**

Fő neurotranszmittereik alapján a hátsó szarvi neuronokat 2 csoportba tudjuk osztani: serkentő sejtekre, amik glutamatergek és vezikuláris glutamate transzporter 2-t (VGLUT2) expresszálnak, valamint gátló idegsejtekre, amik  $\gamma$ -aminovajsavat (GABA -  $\gamma$ -*aminobutyric acid*) és/vagy glycint szabadítanak fel (Todd és Sullivan 1990). Larsson (2017) becslése alapján patkányban a neuronok 36-53%-a a gerincvelő I-III-as laminájában gátló sejt.

Az I-II-es lamina serkentő sejtjei esetén 6 jól elkülönülő neuronpopulációt tudott Gutierrez-Mecinas (2016, 2017, 2019) kollégáival meghatározni neurokémiai markereik

alapján egér gerincvelőben. A serkentő sejtek az I-II-es laminában eredményeik alapján neurotensint (9%), P anyagot (más néven tachykinin 1; 24%), neurokinin B-t (14%), gasztrin-felszabadító peptidet (15%), cholecystokinin-t (7%), vagy neuropeptide FF-t (6%) expresszálnak. A serkentő sejtek további (hozzátevőlegesen) 25%-a ezekbe a csoportokba nem sorolható.

Ugyanez a munkacsoport (Boyle és mtsai. 2017) a továbbiakban a gátló sejtek esetén is feltárt 5 csoportot. Egy minimális átfedést fedeztek fel a galanin- dynorphin (24%) és neuronális nitrogén-monoxid szintáz (nNOS, 17%) pozitív sejtek esetében, valamint a galanin- dynorphin és neuropeptid Y-t (33%) expresszáló sejtek között. Az I-II-es laminában továbbá elkülönítettek parvalbumint (11%) és calretinint (27%) tartalmazó gátló sejteket is. Megjegyzendő, hogy a dynorphin, nNOS, parvalbumin vagy calretinin pozitív sejtek lehetnek serkentő sejtek is (Peirs és mtsai. 2020), ezek megkülönböztetésére használható a Pax2 transzkripciós faktor, mint megbízható gátló sejt marker (Del Barrio és mtsai. 2013; Larsson 2017).

#### ***4.2.3.1 NK1 receptorral rendelkező sejtek eloszlása a hátsó szarvban***

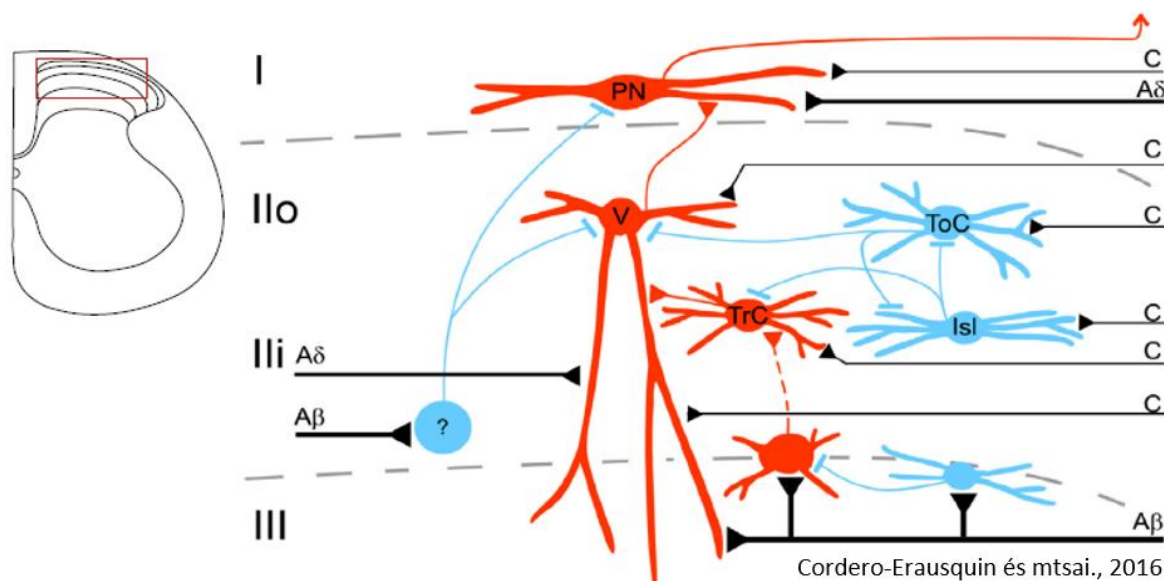
Minden P anyag tartalmú primer afferens részt vesz a nocicepcióban, fő célpontjuk pedig az NK1 receptor, ami behatárolt disztribúciót mutat a hátsó szarvban (Todd 2010). Az I-es lamina sejtjeinek ~45%-a expresszál NK1R-t (Todd, Spike és Polgár 1998), a II-es laminában nagyrészt hiányzik, majd kisebb százalékban újra megjelenik a mélyebb laminákban (LIII-V; Brown és mtsai. 1995; Littlewood és mtsai. 1995).

Az I-es lamina projekciós sejtjei patkányban 80% (Al-Khater és mtsai. 2008; Spike és mtsai. 2003; Todd és mtsai. 2000), míg egérben a sejtek 90% mutat NK1R pozitivitást (Cameron és mtsai. 2015). Bár a receptor serkentő interneuronokban is megtalálható, expressziós szintje alacsonyabb a projekciós neuronokénál (Al Ghamdi és mtsai. 2009). A III-as lamina antenna sejtjei is tartalmazhatnak NK1R-t és ezek a sejtek is megfeleltethetők projekciós neuronokként (Marshall és mtsai. 1996; Naim és mtsai. 1997; Todd és mtsai. 2000).

### ***4.3 FELTÉTELEZETT NEURONHÁLÓZATOK A GERINCVELŐ HÁTSÓ SZARVÁBAN***

A klasszikus immunhisztokémiai jelöléseken alapuló kezdeti leírásokon túl, páros elektrofiziológiai mérésekkel, primer afferens bemenetek stimulálásával és transz-szinaptikus vírusjelölési módszerekkel sikerült azonosítani néhány mikrohálózatot a gerincvelő hátsó

szarvában (2. ábra), azonban még mindig jelentősen hiányosak az ismereteink a teljes szenzoros feldolgozó rendszer tekintetében (Cordero-Erausquin és mtsai. 2016; Todd 2010).



2. ábra **Sematikus ábra a főbb szinaptikus kapcsolatokról az I-III-as laminában normál körülmények között (Cordero-Erausquin és mtsai. 2016).**.. Az I-es lamina projekciós és interneuronokat tartalmaz (az utóbbi nem került feltüntetésre az ábrán). Az I-es lamina projekciós sejtek közvetlen bemenetet kaphatnak C és A $\delta$  primer afferensektől, valamint a hátsó szarv gátló és serkentő interneuronjaitól is. Ezek között lehet verticalis sejt (V) és további, még azonosítatlan (?) gátló interneuron is, ami A $\beta$  bemenetet kap közvetlenül, vagy helyi interneuronok közvetítésével (ezek szintén nincsenek feltüntetve az ábrán). Az islet sejtek (Isl) GABAerg gátló sejtek, amik érintkezhetnek a tónusosan tüzelő centralis sejt (ToC- tonic central cell) vagy verticalis sejt (V) is. A serkentő centralis sejtek elsősorban átmeneti akciós potenciál tüzelést (TrC- transient mode of action potential discharge) mutatnak és a verticalis sejtekhez kapcsolódnak. A serkentő verticalis sejtek sejttestje a II-es lamina külső részében helyezkedik el és hosszú ventralisan elnyúló dendrittel rendelkeznek, amik C és A $\delta$  bemenetet kapnak. A verticalis sejtek dendritjei lenyúlhatnak a III-as laminába is, ahol közvetlen A $\beta$  primer afferens bemenetet is kaphatnak. Az ábrán a serkentő sejtek **piros**, míg a gátlóak **kék** színnel vannak feltüntetve.

A primer afferensek, amik az I-II-es laminában döntően C-rostoktól származnak, projekciós neuronokkal, valamint gátló- és serkentő interneuronokkal egyaránt direkt kapcsolatokat létesítenek a felszínes laminákban (Lu és Perl 2005, Todd 2010). Az interneuronok más interneuronokkal és/vagy projekciós neuronokkal állnak kapcsolatban, ilyen módon összekötik az I-es és II-es laminát. Lu és Perl (2005) munkacsoportja részletesen tanulmányozta ezeket a sejt kapcsolatokat és kimutatták, hogy az I-es lamina projekciós sejtjei információt fogadnak a II-es lamina C, A $\delta$  és A $\beta$  primer afferens bemenettel rendelkező verticalis sejtjeitől, valamint a glutamaterg centralis sejtektől. Igazoltak továbbá gátló kapcsolat meglétét islet és centralis sejt között (Lu és Perl 2003).

A III-IV-es laminában főként gátló szinaptikus kapcsolatok vannak, amik felvetik a lehetőségét, hogy különböző modulációs lehetőségek (neurotranszmitterek vagy neuropeptidek) finomhangolni tudják ezeket a folyamatokat (Cordero-Erausquin és mtsai. 2016).

#### **4.4 ISMERT AXONELÁGAZÓDÁSI MINTÁZATOK A GERINCVELŐ LUMBALIS SZAKASZÁNAK FELSZÍNES LAMINÁIBAN**

Ramón y Cajal (1909) a Golgi-módszer használatával számos gerincvelői neurontípust írt le, melyeket a későbbiekben főként a neuronok szomatodendritikus sajátosságaira, valamint a gerincvelő hátsó szarvában való elhelyezkedésükre alapozva kategorizáltak (Brown 1981; Schoenen 1982; Todd 2010). Ezek a klasszifikációk azonban ritkán vették figyelembe az axon sajátosságait, kiterjedését és lamináris elhelyezkedését (Gobel 1978). A transzgén egerek használatával és az új anatómiai (Gatto és mtsai. 2019; Todd 2017), képalkotó (Kosugi és mtsai. 2013), egy-sejt elektrofiziológiai módszerek használatával (Lu és Perl 2005; Santos és mtsai. 2007; Yasaka és mtsai. 2010), valamint transzkriptciós analízis (Häring és mtsai. 2018) segítségével számos serkentő és gátló neuront sikerült azonosítani a különböző laminákon belül. A gerincvelői hálózatok jobb megértését célozták a különböző technikákat kombináló kísérletsorozatok is (Duan és mtsai. 2014; Gradwell és mtsai. 2022; Smith és mtsai. 2019), amik feltártak bizonyos anatómiai sajátságokat, valamint azonosították egyes sejtípusok posztzinaptikus célpontjait, azonban ezekben az esetekben sem tekintették célnak az individuális sejtekhez tartozó axonhálózat megismerését.

A korai axon kiterjedéssel foglalkozó tanulmányok elsősorban in vivo tormaperoxidáz jelölések eredményei alapján tettek megfigyeléseket majomban és macskában (Beal és mtsai. 1981; Bennett és mtsai. 1981). Később Yasaka (2010) munkacsoportjával morfológiai és elektrofiziológiai paramétereket együttesen vizsgálta II-es lamina serkentő és gátló sejtjei esetén patkányban, míg a III-as lamina cholinerg sejtjeinek axonhálózatát Mesnage és munkatársai (2011), a projekciós neuronokat pedig Browne és munkatársai (2020) vizsgálták. Bár ezek a vizsgálatok hiánypótlónak tekinthetők a neuronhálózatok megértésében, azonban a vizsgálatok gerincvelői szeletpreparátumokban történtek, amik nem teszik lehetővé a nagy kiterjedésű nyúlványok, mint amilyen az axon, kiterjedésének és disztribúciójának részletes és alapos vizsgálatát.

A szeletpreparátum jelentette limitációkat küszöböli ki az a technika, melyet témavezetőm és portugál munkatársai fejlesztettek ki, ami során az IR-LED segítségével lehetővé válik fiatal rágcsálók intakt gerincvelő preparátumainak felszíni vizsgálata (Szücs és mtsai. 2009). A munkacsoport a technika segítségével teljes sejtrekonstrukciókat tudott készíteni az individuálisan jelölt neuronokról és ez által részletes leírást adott az I-es laminában található projekciós (Szücs és mtsai. 2010), illetve interneuronok axonelágazódási mintázatairól (Szücs és mtsai. 2013).

2010-es közleményükben az anterolateralis projekciós neuronok újfajta, az ipsilateralis axonkollaterálisok elágazódási mintázata alapján történő csoportosítási lehetőségét javasolták. Az új klasszifikáció alapján dorsalis, lateralis, ventralis, valamint kevert típusú kollaterálissal rendelkező projekciós neuronokat különböztettek meg. Kimutatták továbbá, hogy a korábban már leírt morfológiai fenotípus (Cheunsuang és Morris 2000; Hylden és mtsai. 1986), azaz az I-es laminában található sejtek főaxonjának dendritikus kiindulása, az anterolateralis projekciós neuronok esetében kifejezetten gyakori, mivel a sejtek kétharmadánál megfigyelhető volt.

Az I-es lamina interneuronok axonelágazódási mintázatának vizsgálata során (2013) megállapították továbbá, hogy azok rostrocaudalisan több szegmentumra kiterjedő, nagyszámú axonvarikozitással (lehetséges szinaptikus terminálissal) rendelkező komplex axonokkal rendelkeznek. Az axonok, akár csak a projekciós neuronok lateralisán elhelyezkedő axonkollaterálisai gyakran léptek ki a funiculus dorsolateralisba, vagy a Lissauer kötegbe, majd onnan ismét vissza a hátsó szarvi szürkeállományba, ami propriospinalis kapcsolatok kialakítására is utalhat.

## 5 CÉLKITŰZÉS

---

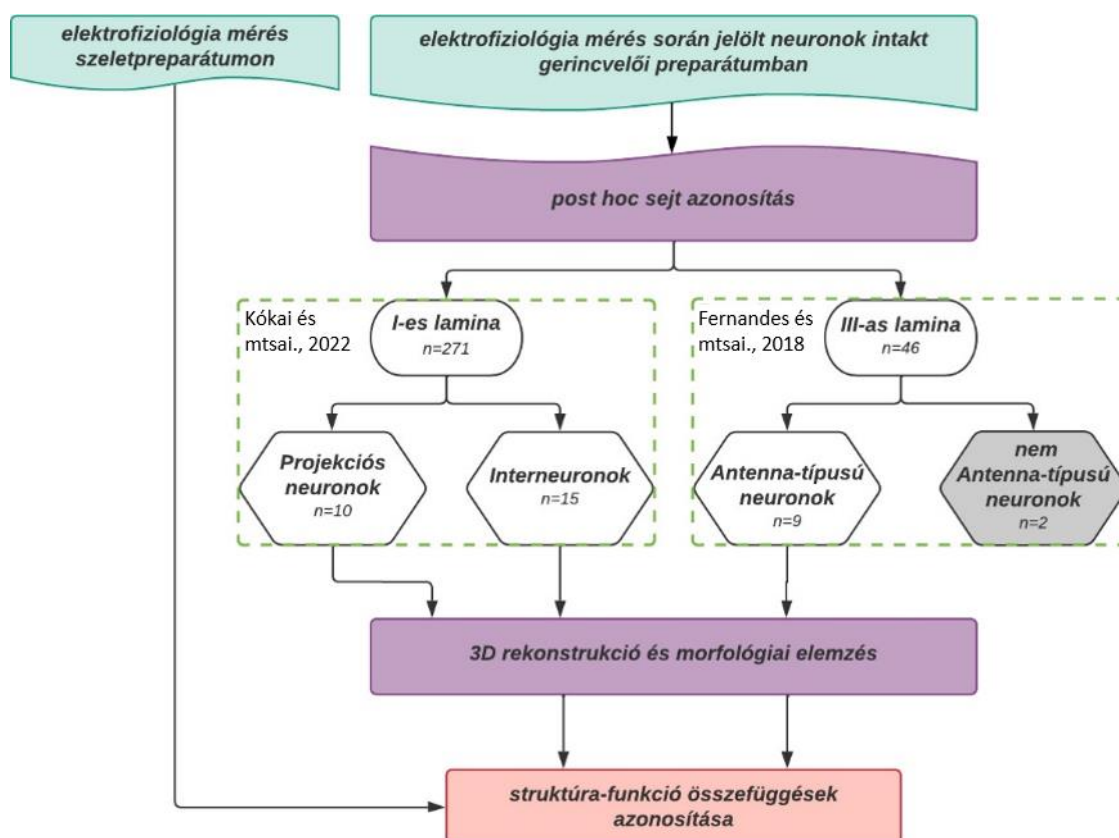
Ahogy az a bevezetésben bemutatásra került a gerincvelő felszínes lamináiban található különböző sejtpopulációk axonjainak elágazódási mintázata még mindig szinte alig ismert, azonban alapvető fontosságú lenne a neuronok kapcsolatrendszerének megismerésében és megértésében. Portói kollaborációs partnereinkkel korábban leírtunk egy alacsony küszöbű rostok által közvetített gátlást (Luz és mtsai. 2014), ami a projekciós neuronokra egy közbeiktatott gátló sejten keresztül érkezik. A vastag rostok elhelyezkedése alapján valószínűsítettük, hogy ez a közbeiktatott gátló sejt valószínűleg a mélyebb laminákban helyezkedik el. Ennek bizonyításához kollaborációs partnereink III-as lamina sejteken végeztek elektrofiziológiai méréseket, amik közül elsőként az antenna-típusú neuronok struktúra-funkció vizsgálatát végeztük el (Fernandes és mtsai. 2018). Ezután egy, az I-es lamina sejtjeit (projekciós és interneuronokat) megcélzó elemzéssorozatot terveztünk, ahol célunk az axon- és dendrithálózat morfológiai paramétereinek kiterjesztettebb összehasonlító elemzése volt, mind a gerincvelői interlamináris lefedettségük, mind szimmetriájuk tekintetében.

***Célkitűzésünk tehát a következők voltak:***

- 1) a rendelkezésünkre álló, előzetesen biocytinnel töltött neuronok teljes 3D rekonstrukcióját követően a lehető legpontosabb kvantitatív és kvalitatív morfológiai elemzés elvégzése, hogy teljesebb képet kapjunk a vizsgált neuronok potenciális kapcsolatrendszeréről
- 2) a korábbi elektrofiziológiai kísérletekből származó megfigyelések és irodalmi adatok összevetése az egyes neuroncsoportok morfológiai vizsgálatával feltárt feltételezett szerepeivel.

## 6 ANYAG ÉS MÓDSZER

Munkám során olyan fiatal (9-20 napos) Wistar patkányok gerincvelőjéből készült preparátumok neuronjait elemeztem, amelyek elektrofiziológiai mérés során lettek megjelölve portugál kollaborációs partnerünk jóvoltából (*Instituto de Biologia Molecular e Celular, Porto, Portugália*). A kísérletek portói partnerünkénél, az ottani laboratórium helyi etikai engedélyével összhangban és annak mindenben megfelelően történt. Az intakt gerincvelő preparátumban megjelölt neuronok szövettani feldolgozását követően a metszetekből a PhD munkámat képező sejtrekonstrukciókat és az azt követő morfológiai elemzést a Debreceni Egyetemen végeztem. A 3. ábra a disszertációban bemutatott munka lépéseiről, a felhasznált neuronok eredetéről és darabszámáról ad áttekintést.



3. ábra **Összefoglaló folyamatábra a dolgozatban elvégzett kísérletekről.** A vizsgált neuronok elektrofiziológiai mérés során biocytinnel lettek feltöltve, amely lehetővé tette a morfológiai elemzést a jelölőanyag láthatóvá tétele után. A szövettani feldolgozást követően a neuronok sejtestjének lamináris elhelyezkedése alapján csoportosítottuk a sejteket, majd 3-dimenzióban (3D) rekonstruáltuk azokat. A III-as lamina antenna sejtjeivel foglalkozó munka során két, morfológiája alapján nem antenna sejtnek bizonyult sejtet (szürkével jelölve) kihagytunk a további elemzésekből. A projekciós neuronok axonkollaterálisainak eloszlása alapján feltételezett funkciókra vonatkozó hipotézis igazolására témavezetőm korábbi, gerincvelői szeleteken végzett, és még nem publikált eredményeit is bevontuk az I-es lamina sejtjeivel foglalkozó közleménybe (2002, Université Louis Pasteur, Strasbourg, Franciaország). Szaggatott vonallal jeleztem az egyes, a disszertációhoz felhasznált eredményekhez tartozó publikációkat.

## 6.1 GERINCVELŐI BLOKKOKBAN- ÉS SZELETPREPARÁTUMOKON VÉGZETT IN VITRO ELEKTROFIZIOLÓGIAI KÍSÉRLETEK RÖVID ÁTTEKINTÉSE

Kutatási munkám patch-clamp technikával, különböző preparátumokban elvezetett és egyidejűleg megjelölt idegsejtek morfológiai elemzése volt. Megjegyzendő, hogy az elemzésekhez felhasznált sejtek elektrofiziológiai elvezetése és elemzése során nem voltam jelen, ennek megfelelően a releváns elektrofiziológiai vizsgálatok metodikáját is csak röviden ismertetem, eredményeikről csak a diszkusszióban a struktúra-funkció megvitatása során tesztek említést.

A gerincvelői blokkpreparátum elkészítéséhez 9-20 napos Wistar patkányokat  $\text{Na}^+$ -pentobarbital intraperitoneális injekciójával altatták, majd a talp visszahúzási reflex eltűnése után az állatot dekapitálták. A gerincvelőt gyorsan eltávolították és oxigenizált arteficialis agy-gerincvelői folyadékba (ACSF- *arteficial cerebrospinal fluid*- összetételének részletes leírása: Fernandes és mtsai. 2018) helyezték. Az I-es lamina sejtek elvezetése során a lumbalis szakaszt (L1-L6) 3 különálló darabra osztották (L1-L2, L3-L4 és L5-L6), míg a III-as lamina sejteknél az L4-5-ös szegmentumokat tartották meg. A gerincvelői blokkok dorsalis felszínéről a pia matert eltávolították mindkét esetben, ilyen módon hozzáférést biztosítva a mérőelektródának a neuronokhoz. A primer afferens bemenetek meghatározásakor (kizárólag a III-as lamina sejtek esetében) az L4 és/vagy L5 hátsó gyökere megtartásra került elektromos stimuláció céljából, az elektrofiziológiai elvezetések pedig kizárólag az L4 szegmentumból történtek.

Az elektrofiziológiai méréseket a blokkpreparátum esetén a gerincvelő szürkeállományának legfelszínebb rétegében (LI), valamint körülbelül 100  $\mu\text{m}$  mélységben (LIII) ferde IR-LED megvilágítási technikával (Szücs és mtsai. 2009) végezték. A sejtest lamináris elhelyezkedése a mérések végeztével a szövettani feldolgozás során, toluidinkék háttérfestés segítségével került minden esetben meghatározásra.

Az elektrofiziológiai mérések teljes-sejt konfigurációban történtek (Fernandes és mtsai. 2018), melyek esetén vastag falú boroszilikát kapillárisból készült pipettákat használtak (ellenállás: 4-5  $\text{M}\Omega$ ; BioMedical Instruments, Németország). A pipettában található belső oldatot (összetételének pontos leírása a következő publikációban megtekinthető: Fernandes és mtsai. 2018) 0,5-1% biocytinnel (Sigma, St. Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok) egészítették ki a neuronok későbbi morfológiai azonosítása céljából. Bizonyos esetekben ( $n=12$ ) az elektrofiziológiai vizsgálat során tanulmányozott neuronok axonjainak neurotranszmitter

tartalmát immunhisztokémiai reakcióval is ellenőrizték (Szücs és mtsai. 2013). Mivel a neurokémiai fenotípus meghatározása a morfológiai vizsgálatokba bevont neuronok 1/3-raterjedt ki, így ezeket az eredményeket a sejtek összehasonlításánál nem vettük figyelembe. Megemlítendő ugyanakkor, hogy ezekben az esetekben 0,5% biocytin és 0,5% rhodamine-red keverékével egészült ki a pipettában lévő belső oldat, ami bár a biocytin jelölés erősségét kis mértékben csökkentette, a részletgazdag 3D rekonstrukciót szignifikánsan nem akadályozta (Szücs és mtsai. 2013).

A mérések során rögzített különböző aktív és passzív membránparaméterek közül kizárólag az emelkedő amplitúdójú depolarizáló áramimpulzusokkal kiváltott ún. tüzelési mintázatot vetettük össze a kapott morfológiai paraméterekkel, mivel ez a paraméter képezi korábban már leírt klasszifikációk alapját is. A hátsó szarvi neuronok tüzelési mintázatainak meghatározásakor portói kollaborációs partnereink és mások által korábban leírt kategóriákat (tónusos, adaptálódó, késleltetett és ritmikus) használtuk fel (Li és Baccei 2011; Luz és mtsai. 2014).

## 6.2 SZÖVETTANI FELDOLGOZÁS

Az elektrofiziológiai mérést követően a gerincvelői preparátum 4% paraformaldehidbe került immerziós fixálás céljából. A szövettani feldolgozás során a gerincvelőket előbb több alkalommal 0,1M foszfát pufferrel (PB) mosták át, majd 2,5% agarózba öntve vibratóm (Leica VT1000) segítségével 100 µm-es sorozatmetszeteket készítettek belőlük.

Munkacsoportunk korábbi morfológiai leírást célzó munkái során döntően sagittalis metszeteket használt (Szücs és mtsai. 2010, 2013), mivel így a kevesebb számú sorozatmetszet a rekonstrukció során könnyebben illeszthető, és az átfedő nyúlványokkal bíró sejtek szétválasztása is egyszerűbb. Ugyanakkor a sagittalis metszetekből történő rekonstrukció, különösen a gerincvelő görbülő laterális szélén, nem teszi lehetővé a pontos mediolaterális és lamináris elhelyezkedés meghatározását. Mivel PhD munkám pontosan ezeknek a hiányzó adatoknak a meghatározását célozta meg, a rekonstrukciókhoz olyan sejteket választottunk, amelyekből a szövettani feldolgozás során a transversalis síkban készítettek metszeteket. A sorozatmetszetek készítésekor itt is kitüntetett figyelmet kapott a metszetek orientációjának megtartása a későbbi rekonstrukció megkönnyítésének céljából. Ennek érdekében a szeletelés folyamata előtt a gerincvelőt tartalmazó agaróz blokk egyik sarkát levágták, a szeleteket pedig 24-lyukú tenyésztő plate egymást követő lyukaiba egyenként gyűjtötték.

A metszést követően az elektrofiziológiai mérés során a sejtbe jutott biocytint a hozzá erősen kötődő tormaperoxidáz (HRP- *horseradish peroxidase*) konjugált avidin 3,3'-diaminobenzidin (DAB) csapadékkal történő kimutatásával tették láthatóvá (Gomba 2005). A folyamat első lépéseként a metszetekben blokkolták az endogén peroxidáz aktivitást 0,6% hidrogén-peroxiddal ( $H_2O_2$ ; 40 percig, szobahőn), mivel a lépés kihagyása a vörösvértestek intenzív barna jelölését eredményezné, amik pedig elfedhetik a vékony sejtnyúlványokat a rekonstrukciók során. Ezután 50%-os alkohollal permeabilizálták a metszeteket (1 óra, szobahőn; Gomba 2005). A lépések között minden alkalommal többször váltott mosást alkalmaztak, ügyelve arra, hogy a metszetek ne tapadjanak ki a plate lyukainak falához vagy aljához.

Az alkoholos feltárást követően a foszfát mosópuffer (0,1 M) helyett a továbbiakban sós-Tris- foszfát puffert (TBS) használtak, amit 0,1% triton x-100-zal egészítettek ki a penetráció javításának érdekében. Ezt követően ExtrAvidin-Peroxidáz konjugátum jelenlétében inkubálták a metszeteket (ExtrAvidin-Peroxidase; Sigma, St. Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok, 1:1000) 2 óráig szobahőn, majd 4°C-on egész éjszaka. Az alapos mosás után végezték el a DAB kromogén reakciót, aminek hatására egy barna színű, oldhatatlan csapadék keletkezett a biocytint tartalmazó sejtnyúlványokban. A reakció előrehaladását preparáló mikroszkóp alatt követték nyomon, hogy a zavaró háttérjelölés megjelenése előtt leállítható legyen a reakció TB-vel (Tris- foszfát puffer) történő mosással.

A DAB-bal történt vizualizálást követően a metszeteket tisztított króm-kálium-szulfát zselatinnal fedett tárgylemezre húzták fel, ügyelve a metszetek sorrendjére és orientációjára. A száradás után a metszeteket rehidrálták, majd a laminák határainak meghatározásának érdekében, valamint, hogy a jelölt struktúrák könnyebben észrevehetőek és követhetőek legyenek, toluidinkék (0,1%) háttérfestést alkalmaztak. Víztelenítés, majd xylolos derítést követően a metszeteket végezetül DPX-szel (Sigma, St. Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok) fedték le.

### 6.3 A SEJTREKONSTRUKCIÓK MENETE

A III-as laminában található sejtek vizsgálatát célzó kísérletsorozatban összesen 119 hátsó szarvi idegsejt jelölése történt meg biocytinnel az elektrofiziológiai mérések során, azonban a post hoc azonosítás után a III-as laminában történő elhelyezkedés 46 esetben igazolódott. Ezen jelölt sejtek közül 9 volt olyan, amely egyrésről megfelelő minőségű jelölést

mutatott, másrésről megfelelt az antenna sejtek irodalomban közölt szomatodendritikus morfológiai megjelenésének: ezek a sejtek jellegzetesen egy az I-es lamina irányába húzódó dendrittel, és több, a sejt közelében, valamint a mélyebb laminákban elágazó dendritekkel bírnak. Néhány blokkpreparátumban több mint egy idegsejtből történt elvezetés (és ezzel egyidőben jelölés), ezekben az esetekben minden jelölt sejt összes darabját rekonstruálnom kellett, hogy azok nagy bizonyossággal szétválaszthatóak legyenek a későbbi analízishez. Ennek következtében a 9 antenna sejt mellett további 2 neuront rekonstruáltam, amik a morfológiai kritériumok alapján nem bizonyultak antenna sejteknek (a továbbiakban, ezekre, mint „nem antenna-típusú” sejtekként hivatkozunk), bár kompletten rekonstruálva lettek, a kis esetszám miatt nem kerültek be az analízisünkbe.

Az analízishez felhasznált I-es lamina neuronok több, korábban publikált elektrofiziológiai munka során jelölt sejtek közül kerültek kiválasztásra. A sejtek morfometriai analízisét korábbi publikációkban még nem végezte el senki, azonban a jelölt neuronokat adatbázisba rendeztük, ezek közül kiválasztottuk az analízisre alkalmas sejteket. A kiválasztás elsődleges kritériuma az volt, hogy a szövettani feldolgozás során a sorozatmetszetek orientációja transversalis legyen, hiszen csak így tudtuk a lamináris eloszlásokat és a mediolaterális szimmetriát, elhelyezkedést vizsgálni, valamint összevetni őket a III-as lamina antenna sejtjeinél már elvégzett analízisek eredményeivel. További kritériumunk volt, hogy a sejt szómája igazoltan az I-es laminában helyezkedjen el, a jelölés a szövettani feldolgozást követően erős és jól követhető legyen, valamint rendelkezzen a projekciós- vagy interneuron kategóriára jellemző morfológiai jegyekkel. Az adatbázisban 271 darab I-es lamina sejtet találtunk, amiből 62 esetben volt a metszési sík transversalis. A fent megnevezett töltési minőségre vonatkozó kritériumok alapján végül 10 db projekciós neuron (PN), valamint 15 db interneuron (IN) került be a végleges morfometriai elemzésbe.

A neuronok 3 dimenziós rekonstrukcióit Neurolucida szoftver (9-es és 10-es verzió; MBF Bioscience, Williston, Amerikai Egyesült Államok) segítségével végeztük el a sorozatmetszeteket tartalmazó tárgylemezekről. A használt verziók között jelentős különbség nincs, a későbbi verziófrissítésekkel a felhasználók által leginkább előtérbe került konfokális felvételek rekonstrukciójához igyekeztek fejlesztésekkel hozzájárulni. Bár számos hasznos modul építettek be az újabb verziókba (pl. dendrittűskék utólagos hozzáadása a rekonstrukciókhoz), a számunkra elérhető verziók a kidolgozott elemzési stratégiának messzemenően megfeleltek, továbbá egyes esetekben lehetővé tette a neuronok

nyúlványhálózatának összekötését. Mivel ezt nem tudtuk minden esetben kivitelezni, így ezen eredményeink nem kerülnek bemutatásra.

A rekonstrukció során a sejttestet tartalmazó metszetből kiindulva rajzoltam ki a jelölt neuron nyúlványainak a metszetben található szakaszait (100x, immerziós objektív használatával), majd követtem azokat a többi metszetben, amíg a jelölés detektálható volt vagy nem hagyta el a blokkból készült utolsó metszetet. A nyúlványok kirajzolása a Neurolucida rendszerrel pontról pontra történik, olyan módon, hogy a fókuszban lévő rögzített pont x, y, és z koordinátáját tárolja a rendszer, megjegyezve az adott nyúlvány aktuális vastagságát is, amit a metszet számítógép monitorra vetített képe alapján a rekonstruálást végző személy határoz meg. A gerincvelői sejtek nyúlványainak azonosításakor a következő sajátosságokat vettem figyelembe: a dendritek fokozatosan vékonyodó nyúlványok, felszínükön alkalmanként dendrittüskéket („spine”-okat) tartalmaznak, míg az axonok a kezdeti vastagabb szakasz után közel azonos vastagságúak, míg a vékony kollaterálisokon gyakran különböző nagyságú (0,5-1,5µm) varikozitások is megtalálhatóak (Szücs és mtsai. 2010, 2013).

A vizsgált idegsejtek esetében a nyúlványok az esetek jelentős részében (n= 25) elérték a preparátum rostralis és/vagy caudalis végét (az irányok meghatározása az első és utolsó metszetek fehér- és szürkeállományának aránya, illetve utóbbi alakja alapján történt). Ezen sejtek esetében a rostrocaudalis kiterjedés minden esetben alulbecsült (5. táblázat).

A korábban sagittalis metszetekből történt rekonstrukciókhoz képest transversalis metszeteinkben a rostrocaudalis kijelölt sejtek nyúlványai lényegesen több darabra lettek felszabdalva a sorozatmetszetek készítésekor. Mindemellett a metszetek az inkubálások során, különösen a felszedésnél, különböző nem azonos mértékű alakváltozásokon mentek keresztül (zsugorodás, torzulás), így a nagyszámú kis nyúlványdarab egységes nyúlvánnyá összekötése csak néhány esetben történt meg. Ez azonban nem akadályozta az analíziseinket, mivel azokhoz az egységes nyúlványhálózatra nem volt szükség.

#### **6.4 KVANTITATÍV MORFOLÓGIAI ELEMZÉSEK**

A rekonstruált sejtek nyúlványdarabjainak eloszlását Neurolucida Explorer szoftverrel vizsgáltam (9-es és 10-es verzió; MBF Bioscience, Williston, Amerikai Egyesült Államok). A lamináris eloszlások és a sejtek helyzetének meghatározásához elengedhetetlen, hogy a metszeteken a vizsgálni kívánt területeket zárt kontúrokkal legyenek körbevéve, ugyanis a program ezeken belül tudja a nyúlványok, markerek mennyiségét meghatározni. Ezt követően

az adott régióban előforduló nyúlványhálózat gyakoriságát a következők szerint határoztuk meg:

$$\text{gyakoriság(\%)} = \frac{0,1\% - \text{nál több nyúlvánnyal rendelkező sejtek száma adott régióon belül (n)}}{\text{a vizsgált neuronok száma az adott sejttípuson belül (n)}} \times 100$$

Megjegyzendő, hogy a vizsgált projekciós neuronok esetében a főaxont kihagytuk az elemzésből, mivel ennek lefutása jól karakterizált és nem játszik szerepet lokális kapcsolatok kialakításában (Szücs és mtsai. 2010).

#### 6.4.1 Interlamináris megoszlás elemzése

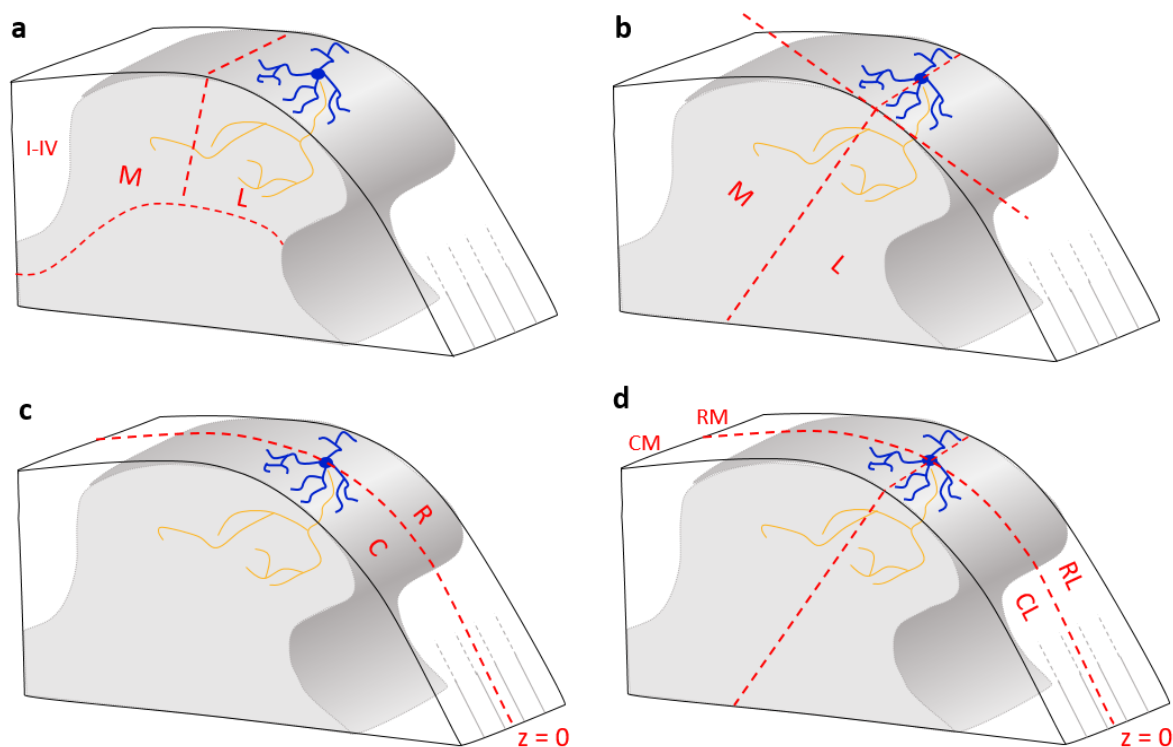
A laminahatárok meghatározásakor a munkacsoportunk korábbi közleményeiben használt, neonatalis patkányokkal végzett kísérletekből adaptált lamina-határokat vettük alapul, hiszen fiatal patkányokra standardizált atlasz nem áll rendelkezésre. A laminahatárok megrajzolásához a toluidinkék háttérfestéssel kezelt lumbalis gerincvelő metszetek sejtsűrűség és méret eloszlásai alapján a szürkeállományon belüli jellegzetes területeket vettük figyelembe (Molander és mtsai. 1984). Ezek alapján 7 régiót definiáltunk: a II-es laminában jellegzetesen sok, kis méretű neuron található, ettől dorsalisán található, többnyire nagyobb sejtekből álló, egy sejtsornyi réteg adta meg az I-es lamina régióját. A III-IV-es lamina ventralis határát egy, a felnőtt patkányoknál leírt (Paxinos és Watson 2007) ívelt vonallal választottuk el az V-VI-os lamináktól, ami lateralisán a hátsó szarv nyaki behúzóadásától indul, és a medialisán a funiculus posterior alsó határának és a canalis centralis távolságának felezőpontjánál végződik. A canalis centralis felső pontján átfektetett horizontális vonaltól lefelé terjedő szürkeállományt egységesen, mint VII-X-es laminák kezeltük (Szücs és mtsai. 2003). A fehérállományt funiculus dorsalisra (DF), lateralisra (LF - *a funiculus dorsolateralis (DLF) is ide tartozik, bár elemzéseinkben külön ezt a régiót nem vizsgáltuk*) és ventralisra (VF) határoltuk el a be- és kilépő gyökök alapján. A fent leírt beosztás alapján a nyúlványok helyének meghatározását mind az ipsi-, mind a contralateralis oldalon elvégeztem.

A hátsó szarv I-IV lamináit magában foglaló területet medialis és lateralis félre osztottam (4. ábra, a) a hátsó szarv felszíni kontúrjának középpontjára állított merőleges vonallal annak érdekében, hogy meghatározzam (a kizárólag lateralis elhelyezkedésű) neuronjaink milyen mértékben fogadnak bemeneteket a medialis félből és küldenek kimenetet oda. Mivel az I-es lamina sejtek nagyon közel helyezkednek el a felszínhez, így úgy döntöttünk, hogy eltekintünk az dorsoventralis elemzések elvégzésétől.

#### 6.4.2 Sejtszimmetria elemzése

A sejtek axon és dendritfa szimmetriáját mediolateralis és rostrocaudalis irányokban határoztam meg. Ezt a vizsgálatot a többek között a gerincvelői hátsó szarv ismert mediolateralis aszimmetriája (pl. medialis gyökérbelépési zóna vastag afferenseinek jelenléte) tette indokolttá. A mediolateralis (ML) szimmetria esetén (4. ábra, b) a gerincvelő dorsalis felszínére, a vizsgált neuron szómájának középpontjára állított merőleges vonal jelölte ki a szimmetriatengelyt, míg a szomszédos metszeteken a szimmetriatengelyt ugyanebben a pozícióban vettem fel és határoztam meg a medialis és lateralis szimmetriarészben elhelyezkedő nyúlványok mennyiségét. A rostrocaudalis (RC) szimmetria meghatározásakor (4. ábra, c) szimmetria síknak azt a z-értéket vettem, ahol a sejtestest kontúrja a legélesebben rajzolódott. Mivel a Neurolucida szoftver a z-tengely mentén is (az x- és y-tengely mellett) rögzíti az adatpontokat, ortogonális nézetben lehetőség van ún. „z-szűrést” elvégezni, aminek segítségével jelen esetben a szómát figyelembe véve a kirajzolt neuron nyúlványdarabjait rostralisán és caudalisán el tudtuk különíteni.

A szimmetriavizsgálatok kombinálásával ezt követően a szóma körüli teret 4 részre osztottam: rostromedialis (RM), rostrolateralis (RL), caudomedialis (CM) és caudolateralis (CL) és ezekben is meghatároztam a dendritek és axondarabok arányát, az egymáshoz viszonyított elhelyezkedését (4. ábra, d).



4. ábra **Sematikus ábra a jelölt sejtek nyúlványainak elemzéséről.** a) a hátsó szarv I-IV-es laminájának medialis és lateralis felét egy, a szürkeállomány mediolateralis távolságának felénél behúzott merőleges segédvonal által meghatározott térrészek alapján határoztuk meg. b) a nyúlványok mediolateralis szimmetria megadásához a hátsó szarv felszíni kontúrjának a neuronhoz legközelebb eső pontjára állított merőleget tekintetem szimmetriatengelynek (piros szaggatott vonal). c) a rostrocaudalis szimmetria esetén a sejtest legélesebb kontúr z-értékét tekintetem a sejt közepének ( $z = 0$ ). d) a sejtest-központú eloszlás analízisnél a mediolateralis és az előzőekben  $z$  tengely mentén meghatározott  $z = 0$  pont által kialakított segédvonalak mentén elemeztem a sejtest körül definiált 4 térséget. Az itt ismertetett elemzésekhez az adott eredményeknél további sematikus ábrákat mellékelünk, amik segítségül szolgálhatnak az elemzés áttekintésében.

A dolgozat hátralevő részében az **axonok** jelölésére a narancssárga színt (és annak árnyalatait) használunk, míg a **dendrit**ek és a **szóma** kék színnel (és annak árnyalataival) lesznek feltüntetve.

### 6.4.3 Statisztikai elemzés

Az összehasonlíthatóság céljából a nyúlványhosszak abszolút értékei helyett, ahol csak lehetett, a sejt teljes nyúlványhosszára normalizálva tüntettük fel a számadatokat. Minden eredmény átlag  $\pm$  az átlag szórása (SEM- *standard error of the mean*)-ként van megadva. A statisztikai elemzéseket Origin 9 szoftverrel végeztük el (Microcal Software, Northampton, MA, USA), ahol a sejtek aszimmetria összehasonlítása esetén one-way ANOVA-t, a laminákon belüli megoszlás különbségének meghatározásához Mann-Whitney tesztet használtunk.

## 7 EREDMÉNYEK

---

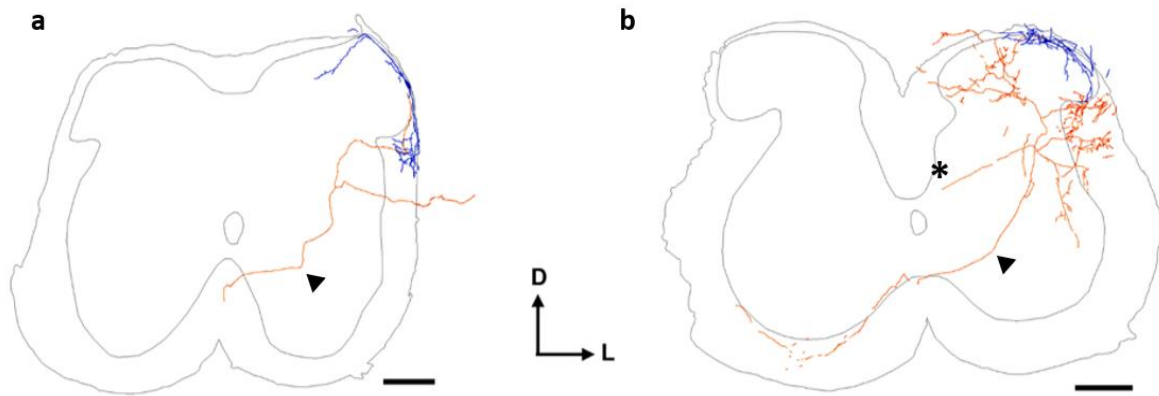
PhD munkám fő célja fiatal patkány gerincvelő hátsó szarvának felszínes lamináiban található neuronokhoz tartozó axonkollaterálisok és dendritfák lamináris eloszlási mintázatainak vizsgálata volt. Összesen 317 neuronból kiválasztott 34 sejt összehasonlító elemzését végeztem el teljes sejtrekonstrukció elvégzését követően: ebből 25 db az I-es laminában helyezkedett el (10 projekciós neuron és 15 interneuron), míg további 9 (antenna) sejt a III-as laminában foglalt helyet.

A szövettani feldolgozást követően a transversalis metszetek eltérő torzulása és zsugorodása általában a rövid nyúlványszakaszok pontos illesztését és ennek következtében a nyúlványok összekötését nem tette lehetővé, emiatt jelen elemzés eltér témavezetőm korábbi munkáiban elvégzett morфомetriai analíziseitől (Antal és mtsai. 2016; Szücs és mtsai. 2010, 2013). Ugyancsak technikai megfontolásból a disszertációmban a rostrocaudalis kiterjedés analízisére nem térünk ki részletesen, mivel ezek az értékek valószínűleg alulbecsültek, ugyanis a vizsgált sejtek 73,5%-a (25 sejt a 34-ből) rendelkezett egy vagy több olyan nyúlvánnyal, ami a blokk egyik vagy mindkét végét elérte (5. táblázat). Újfajta elemzési metodikánk ugyanakkor eddig nem ismert morfológiai sajátosságokat tárt fel a gerincvelő hátsó szarvának felszínes neuronjaival kapcsolatban.

### 7.1 I-ES LAMINA SEJTEK

#### 7.1.1 Projekciós neuronok

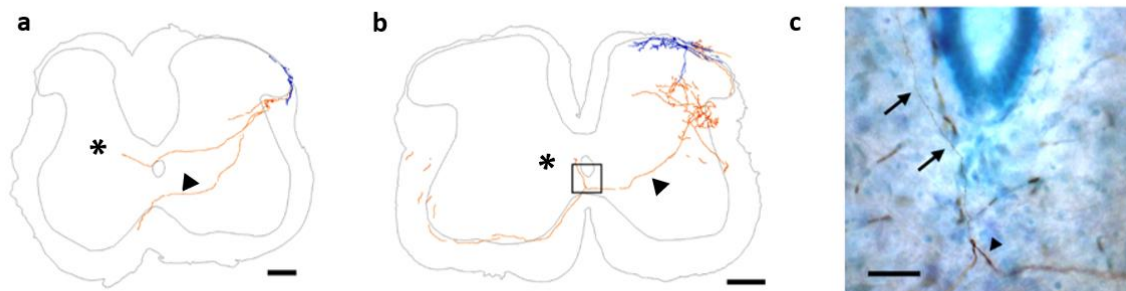
Az I-es laminában található projekciós neuronok fő jellegzetessége, hogy az ellenoldali anterolateralis fehérállományban felszálló főaxonnal rendelkeznek (5. ábra), ami közvetlenül indul ki a sejttestből vagy egy fődendritből. Ezt a jellegzetességet használtuk fel a projekciós és interneuronok elkülönítésére ebben a dolgozatban. A kirajzolt sejtek közül 9 projekciós sejt főaxonja keresztezte a commissura anterior-t és az ellenoldali anterolateralis oszlopban haladt tovább (ALT-PN), míg egy esetben a főaxon átlépése nem volt vizualizálható, mivel elhalványult az V-ös lamina magasságában még az átlépés előtt. Kezdeti szakaszának megjelenése azonban nagymértékben hasonlított a másik 9 vizsgált projekciós neuronhoz, ezért ezt az idegsejtet is ALT projekciós neuronnak tekintettük (2. táblázat).



5. ábra **Példa projekciós neuronokra.** (a) Lateralis- (sejtazonosító: PN5) és (b) kevert- (PN8) típusú kollaterálisokkal rendelkező PN-ek eltérő dendritfákkal. A vizsgált esetekben legfőképpen ezzel a 2 dendritfa megjelenéssel találkoztunk: (a) a dendritfa elnyúlt a hátsó szarv mentén, dendritjeinek jelentős része a fehérállományban helyezkedett el (funiculus lateralis; LF) (b) vagy hosszan elnyúlt a szürkeállományban, egyes esetekben leértek még a mélyebb laminákba is. Lépték: 250  $\mu$ m. A főaxont, ami nem képezte vizsgálatunk tárgyát nyílhegygel jelöltük. A csillag a (b) panelen található rekonstrukción egy olyan axonkollaterális jelöl, amely a commissura posterior irányába tart és ugyan elhalványult, de lefutása azt sejtetheti, hogy átlép az ellenoldalra. A bemutatott rekonstrukciónál a sorozatmetszetekben kirajzolt gerincvelői fehér- és szürkeállomány kontúrok közül csak azt tüntettük fel, amely a szómát tartalmazó metszethez tartozott. Emiatt egyes esetekben úgy tűnhet, hogy egyes nyúlványdarabok elhagyják a gerincvelőt.

Mivel a myelinizált főaxon nem létesít kapcsolatot a környező sejtekkel, azaz nem vesz részt a lokális kapcsolatok kialakításában, ezért a bemutatott elemzésekben csak és kizárólag az axonkollaterálisokat használtuk fel. A rekonstruált sejtek bemutatásakor azonban a főaxont feltüntettük az ábrákon és nyílhegygel jelöltük (5-6. ábra). Egy esetben, egy ALT-PN neuron nem rendelkezett axonkollaterálissal, így ennek a sejtnek csak a dendritfájának disztribúcióra vonatkozó adatait vettük figyelembe az elemzéseknél.

Az 5. ábra, b paneljén bemutatott, valószínűsíthetően a contralateralis oldalra átlépő axonkollaterálishoz hasonló módon a vizsgált 10 ALT-PN-ből 3 esetben egyértelműen találtunk átkereszteződést a commissura posteriorban vagy anteriorban (6. ábra, a-b). Ez az új axonkollaterális típus korábban a sagittalis metszetekben nem került leírásra, valószínűleg a metszési síkból kifolyólag, mivel egy a síkra merőlegesen futó vékony axonkollaterális elhalványulva nehezen megkülönböztethető.



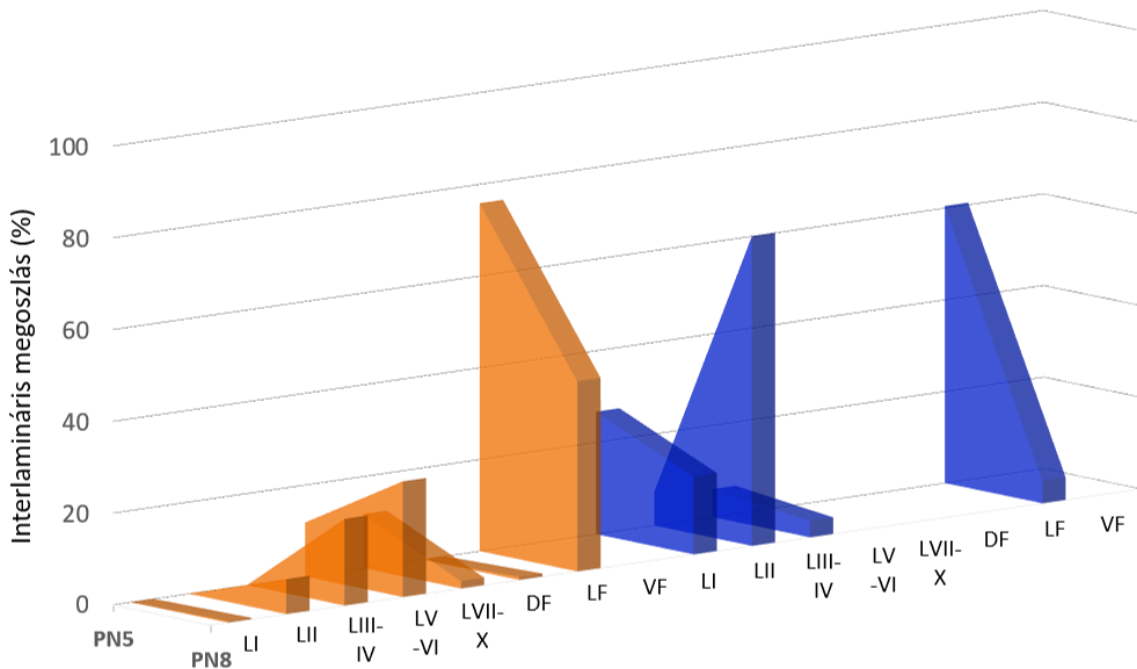
6. ábra **Korábban nem ismert axonkollaterális típusok ALT-PN-okban.** Egy-egy példa (a) a commissura posteriorban (PN3) vagy (b) anteriorban (PN6) átmenő kollaterálisokra. A főaxon nyílhegygel van jelölve, míg a kereszteződő kollaterálisok csillaggal. Érdekesség, hogy a (b) panelen található PN esetében a kollaterális már az ellenoldalon ágazik le a főaxonból. A (c) fotón a (b) panelen bemutatott sejt axonkollaterálisa látható a canalis centralis szomszédságában. A kollaterális nyilakkal van megjelölve. Lépték: 250  $\mu$ m (a, b) és 100  $\mu$ m (c)

#### 7.1.1.1 Interlamináris megoszlás

A gerincvelő szürke- és fehérállományát az anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint a következő régiókra osztottuk fel: I-es, II-es, III-IV-es, V-VI-os, VII-X-es laminára, valamint funiculus dorsalis, lateralis és ventralisra, majd meghatároztuk az adott régiókban a százalékos axon és dendritmennyiségeket (a régióba eső nyúlványdarabok összhossza osztva a teljes nyúlványhosszal, amennyiben meghaladták a legalább 0,1%-os megjelenést).

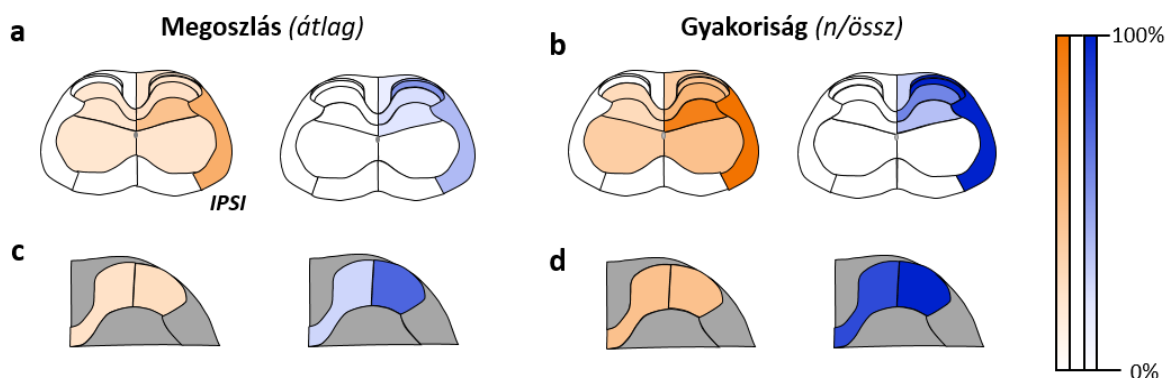
Az 5. ábrán példaként bemutatott két sejt a PN csoport két szélsőséges megjelenési formáját mutatták, ipsilateralis oldalon elvégzett régiónkénti nyúlványanalízisüket a 7. ábra mutatja be. Dendritjeik preferált laminái ugyanazok, de eloszlásuk eltér: a lateralisabban lévő sejt lényegesen több dendritet ad az LF (kizárólag a DLF) területére, míg a medialisabb sejt dendritjei inkább az I-II laminákban dúsulnak. Lokális axonkollaterálisaik elhelyezkedése is két szélsőséget mutat, amire a magyarázatot elsősorban a kollaterális típus adhatja: a lateralis kollaterálisú PN lokális axonjának döntő többsége az LF területén, míg a kevert kollaterális típusú PN axonja az LF-en kívül a mélyebb gerincvelői laminákban található meg.

### PN5 és PN8 axon- és dendritmegoszlás ipsilateralisan



7. ábra **Interlamináris axon- és dendritmegoszlás az ipsilateralis oldalon.** (a) Az 5. ábrán példaként bemutatott neuronok (PN5 és PN8) régiónkénti nyúlványeloszlás analízise. LI – I-es lamina; LII – II-es lamina; LIII-IV – III-as és IV-es lamina együtt; LV-VI – V-ös és VI-os lamina együtt; LVII-X – a szürkeállomány intermedier és ventralis része egyben; DF – funiculus dorsalis; LF – funiculus lateralis; VF – funiculus ventralis.

Amennyiben az összes PN lokális axonkollaterálisainak eloszlását vizsgáljuk (8. ábra), akkor feltűnhet, hogy a mélyebb (III-VI) laminák és az LF (megfigyeléseink alapján minden esetben a DLF) az elsődleges előfordulási hely. Ugyancsak érdekes megfigyelés volt, hogy a lokális kollaterálisok, ha nem is minden sejt esetében és nem nagy arányban, de a contralateralis oldalon is megtalálhatóak voltak. Dendritjeik ugyanakkor a felszínes laminákat részesítették előnyben, a hátsó szarv medialis felében a sejtek 70%-a, míg a lateralis félben, ahol a sejtestjük is elhelyezkedett, 100%-uk rendelkezett dendrittel, százalékos megoszlásukat tekintve pedig még egyértelműbb laterális dominanciát mutattak (8. ábra, c-d).

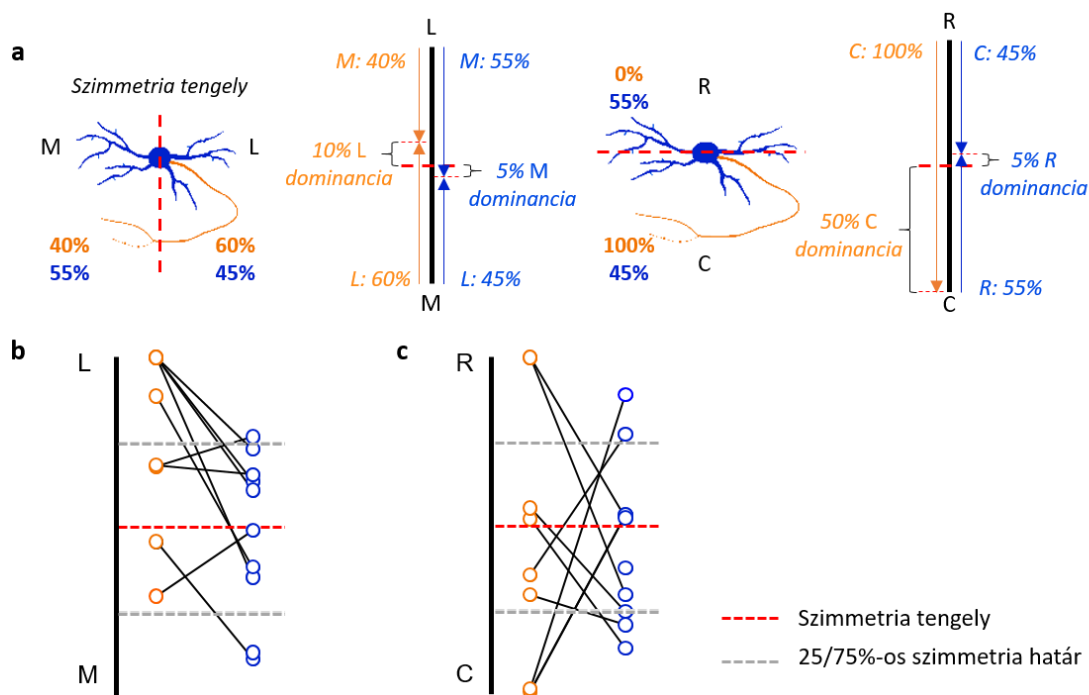


8. ábra **Szintérkép a PN nyúlványok interlamináris százalékos megoszlásának és megjelenési gyakoriságának áttekintéséhez.** (a) A PN dendritek legnagyobb százaléka a II-es laminában jelent meg, valamint az I-es laminában és a DLF-ben voltak főként megtalálhatók. (b) A színskála alapján látható százalékos eloszlásokhoz az adott laminákban 100%-os előfordulási gyakoriság társult (sötétkéék színek az I-es, II-es laminákban és a DLF-ben). A mélyebb laminákban előforduló dendritszakaszok százalékos arányukat tekintve elhanyagolhatók, de az előfordulási térképeken mérhető értékeket eredményeztek. Az axonok mind százalékos (a) megoszlásukban, mind előfordulási gyakoriságukban (b) a mélyebb laminákat (LV-VI) és a DLF-et preferálták, valamint az ellenoldalra is áttérjedtek bizonyos esetekben. (c-d) Mediolateralis eloszlás szempontjából a PN dendritek polarizáltabbnak mutatkoztak (lateralis dominanciával), mint a lokális axonkollaterálisok. IPSI- ipsilateralis oldal

#### 7.1.1.2 Sejtszimmetria

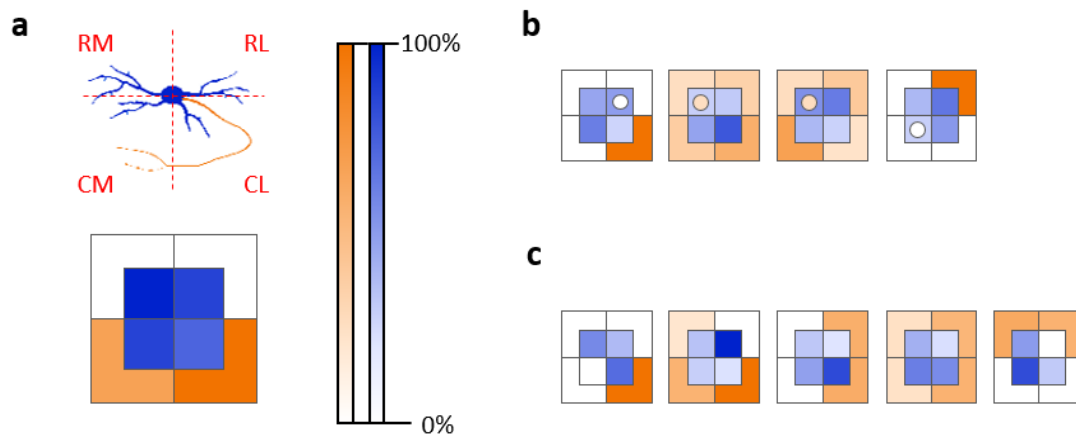
A PN dendritek eloszlásának kismértékű polarizáltsága felvetette, hogy van-e összefüggés a sejtek bemenetét képező dendritek-, és a kimenetet jelentő, lokális célpontokat definiáló axon eloszlási mintázatai között. Ezt az összefüggést a sejtcsoportokon belül az egyes sejtekre vetítve elemeztük (9. ábra, b-c), majd a sejtcsoportok között is összehasonlítást tettünk (7.3 fejezetben). A vizsgálathoz a sejtek körüli teret a szómán keresztül medialis és lateralis, valamint rostralis és caudalis térrészekre osztottuk fel (9. ábra, a).

A mediolateralis szimmetriájukat tekintve a vizsgált PN-ek esetében az axonok és dendritek általában azonos oldali dominanciát mutattak és ritkán voltak a szimmetriatengely közelében, azaz viszonylag polarizáltak voltak valamely irányban (9. ábra, b). Azonban a rostrocaudalis szimmetria vizsgálata alapján a dendritdominancia oldalával ellenkező oldalon volt jellemző az axondominancia, valamint egy a polarizáltság nagyobb fokú volt a vizsgált PN populációnál (9. ábra, c). Rostrocaudalis viszonylatban axonkollaterálisok néhány esetben (n=3) csak az egyik oldalon jelentek meg, ami azzal magyarázható, hogy a főaxonból kiinduló kollaterális a szómától messzebb ágazott le és sem az a kollaterális, sem további esetleges leágazások nem tértek vissza a szóma térségébe, vagy nem érték azt el.



9. ábra **A PN sejtek szimmetria analízise mediolateralis és rostrocaudalis irányok mentén.** (a) Az analízis sematikus bemutatása horizontális síkban: az adott oldalon elhelyezkedő axon és dendrit százalékos mennyiségét az iránytengelyre (ML, RC) vetítve, a nyílhegyek találkozási pontja és a piros szaggatott vonallal jelölt szimmetria középpont (50%-50%) közötti távolság adja az adott irány menti dominancia értéket. Szürke szaggatott vonallal a 25/75%-os értékhatárt jelöltük, amennyiben egy pont kívül esett ezeken az értékeken, a sejtet aszimmetrikusnak tekintettük. (b) A mediolateralis szimmetria esetén a PN-ok főként laterális axonkollaterálisokkal rendelkeztek. (c) A rostrocaudalis szimmetria esetén az axon- és dendritdominancia eltérő oldalakon volt megfigyelhető. Bizonyos sejtek közel azonos axon és/vagy dendrit értékkel rendelkeztek, ezekben az esetekben az adatpontok takarják egymást. Továbbá egy dendrit értékhez nem társul axon adatpont, mivel ez a PN nem rendelkezett lokális axonkollaterálissal.

Az utolsó analízis során a neuron körüli teret, a szómát középpontnak tekintve horizontális síkban négy térrészre osztottuk fel (10. ábra, a) és meghatároztuk az adott téregységbe eső axon és dendrit százalékos arányát. Jelen elemzésünk során azonban csak tendenciákat tudtunk felfedezni, a dendrit és axoneloszlás közötti bárminemű korrelációt nem tudtunk tetten érni. Ilyen megfigyelés volt, hogy a dendritből eredő axonok szinte kizárólag mediálisan induló dendritekből eredtek. Az axon legtöbbször caudolateralis dominanciát mutatott, míg a dendritek esetén polarizáltabb (fehér és erősebb kék kvadránsok egyidejű jelenléte) és kevésbé polarizált (homogénebb kék tónusokat mutató négyzetek) vegyesen fordultak elő. Mind a szomatikus, mind a dendritikus eredetű axonokból kiinduló axonkollaterálisok esetében megfigyelhető volt a kifejezetten laterális irányba polarizált axonkollaterális eloszlás.



10. ábra **A PN sejtek nyúlványainak megoszlása a szómára centrált 4 térrészben horizontális síkban ábrázolva.** (a) Sematikus példa az elemzésről. A neuronok nyúlványrendszerének megoszlása (százalékosan) színskálával van ábrázolva, a szómára centrált négy térrészben (rostromedialis, rostrolateralis, caudomedialis és caudolateralis). A külső négyzetek az axon, míg a belső kisebb négyzetek a dendritek arányát mutatják. (b) Dendrit eredetű axonnal bíró PN-ek nyúlványeloszlása. A belső négyzetekben feltüntetett átlátszó kör jelzi az adott térrész dendritjéből kiindult axont. (c) PN-ek szomatikus eredetű, „klasszikus” főaxonnal. (b-c) Mindkét esetben jellemző volt egyfajta laterális irányú axondominancia.

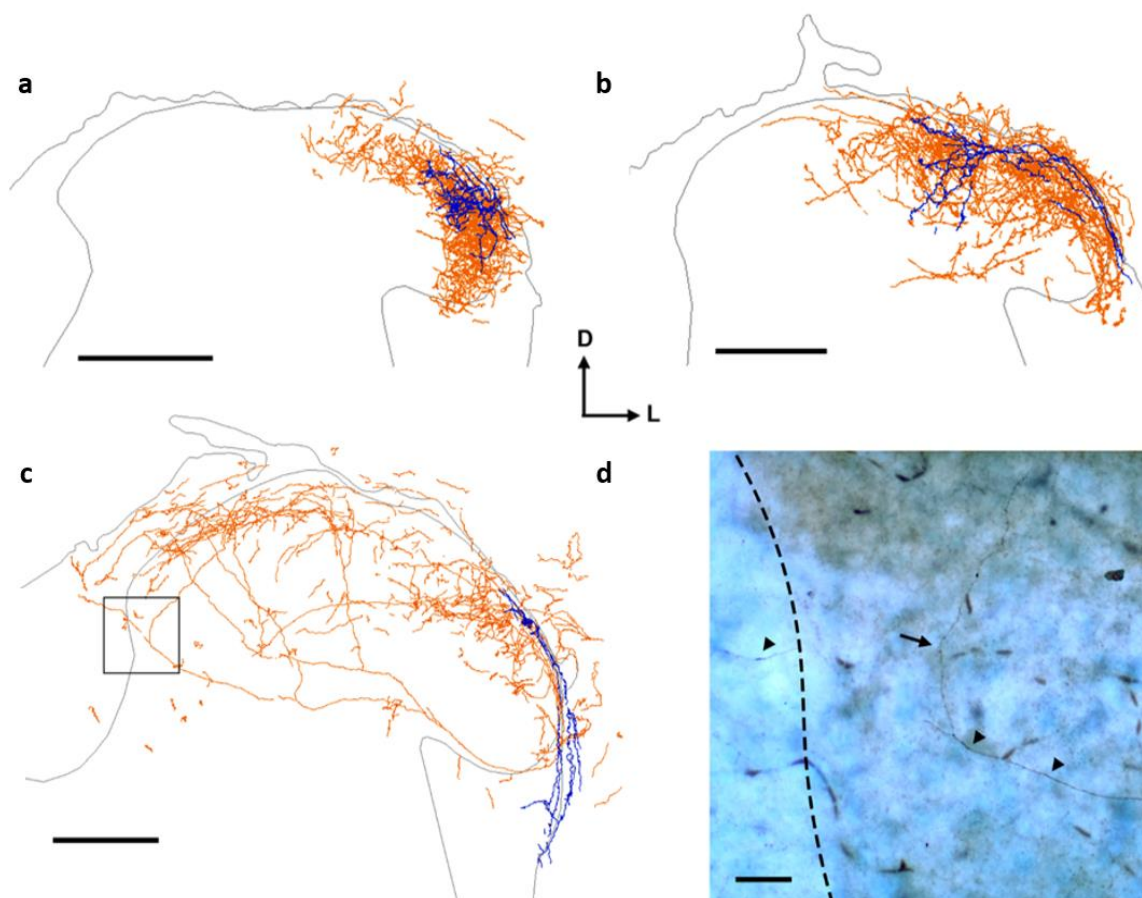
Összegezve elmondhatjuk, hogy a vizsgált PN-ok axonkollaterálisainak megoszlása a korábban leírt mintázat-típusokat tükrözi, valamint főként a felszínes laminákban és a DLF-ben elhelyezkedő dendritekkel térbeli megoszlást tekintve egyértelmű korreláció nem volt igazolható.

2. táblázat Összefoglaló a dolgozatban felhasznált projekciós neuronokról

| <i>Sejtazonosító</i> | <i>szomatodendritikus morfológia (Lima és Coimbra 1986)</i> | <i>kollaterális típusa (Szücs és mtsai. 2010)</i> | <i>tüzelési mintázat (Luz és mtsai. 2014)</i> | <i>axoneredés</i> | <i>elsődleges dendritek száma</i> | <i>a dendrit 50%-a a DLF-ben helyezkedik el</i> | <i>rekonstrukció</i> |
|----------------------|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------|
| <b>PN1</b>           | ellaposodott                                                | lateralis                                         | tónusos                                       | dendrit           | 4                                 | nem                                             |                      |
| <b>PN2</b>           | ellaposodott                                                | kevert                                            | tónusos                                       | szóma             | 4                                 | nem                                             |                      |
| <b>PN3</b>           | ellaposodott                                                | kevert                                            | tónusos                                       | szóma             | 5                                 | igen                                            | 6. ábra, a           |
| <b>PN4</b>           | multipolaris                                                | lateralis                                         | tónusos                                       | dendrit           | 5                                 | nem                                             |                      |
| <b>PN5</b>           | ellaposodott                                                | lateralis                                         | tónusos                                       | szóma             | 2                                 | igen                                            | 5. ábra, a           |
| <b>PN6</b>           | multipolaris                                                | kevert                                            | tónusos                                       | szóma             | 5                                 | nem                                             | 6. ábra, b           |
| <b>PN7</b>           | multipolaris                                                | lateralis                                         | tónusos                                       | dendrit           | 4                                 | igen                                            |                      |
| <b>PN8</b>           | multipolaris                                                | kevert                                            | tónusos                                       | dendrit           | 4                                 | nem                                             | 5. ábra, b           |
| <b>PN9</b>           | piramis                                                     | ventralis                                         | ismeretlen                                    | szóma             | 4                                 | nem                                             |                      |
| <b>PN10</b>          | ellaposodott                                                | nincs kollaterálisa                               | ismeretlen                                    | dendrit           | 4                                 | nem                                             |                      |

### 7.1.2 Interneuronok

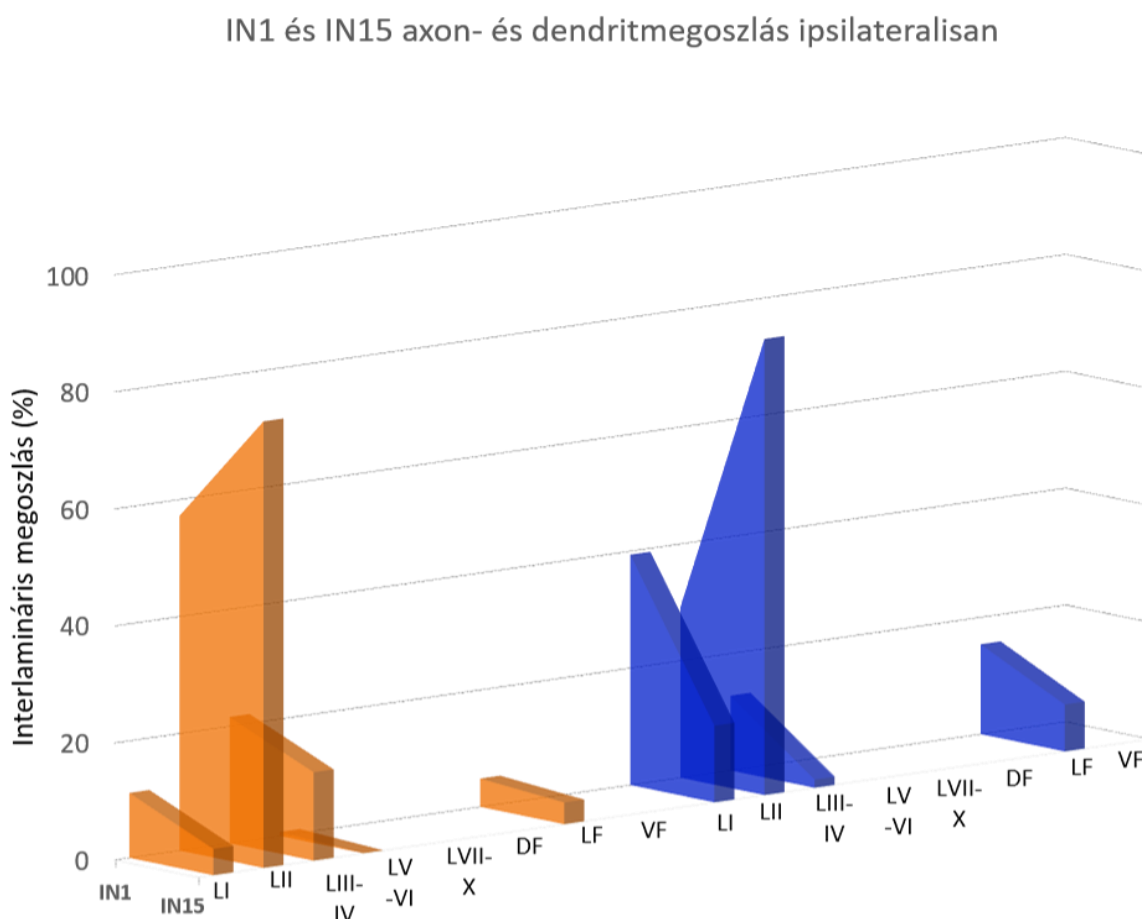
A gerincvelő felszínes lamináiban elhelyezkedő neuronok döntő többsége interneuron (az I-es lamina sejtek 90-95%-a (Todd 2017)), amelyek axonja nem különíthető el egyértelműen főaxonra és lokális kollaterálisra. Az I-es lamina interneuron axonok felhőszerű, több szintű elágazást mutató, sokszor azonos területekre más-más primer ágból visszatérő sűrű hálózatot képez nagyszámú axon varikozitással (Szücs és mtsai. 2013). A rendelkezésünkre álló jelölt sejtekből 15 interneuront tudtunk biztonsággal elkülöníteni az I-es laminában, amik megfeleltek a korábban ismertetett feltételeknek (3. táblázat).



11. ábra **Jellegzetes megjelenésű interneuronok a gerincvelő I-es laminájából.** A sejtek axonja transversalis síkban szemlélve sűrű hálózatot mutat, amely elsősorban a hátsó szarv felszínes lamináit teríti be. Egyértelmű főaxon nem látható, az elágazódás a sejtesthez közel kezdődik el. Transversalis metszetekből történő rekonstrukció után a variábilis dendritfa kiterjedés mellett 2 tipikus axonmegoszlási mintázat volt elkülöníthető: (a) az esetek kb. felében az axon „felhő” nagyobb része a szomatodendritikus kiterjedést nem sokkal haladta meg, látszólag a sejt közvetlen közelében ágazott el (IN1), míg a maradék esetekben (b-c) az axon az egyébként lateralisán elhelyezkedő szomatodendritikus terület lefedésén túl néhány távolabb elágazó oldalág révén a hátsó szarv mediális területére is adott, kevésbé gazdagon, de több szinten elágazó kollaterálisokat. (d) Mikroszkópos felvétel a (c) panelen kijelölt területről. Az ábrán nyílhegy jelöl egy magasabb rendű axont, amely, mielőtt kilép a funiculus dorsalis területére, gyertatartó-szerűen, dorsalis irányban futó kollaterálisokat (egyikük nyíllal jelölve) ad. Lépték: 250μm (a-c), 100 (d) μm

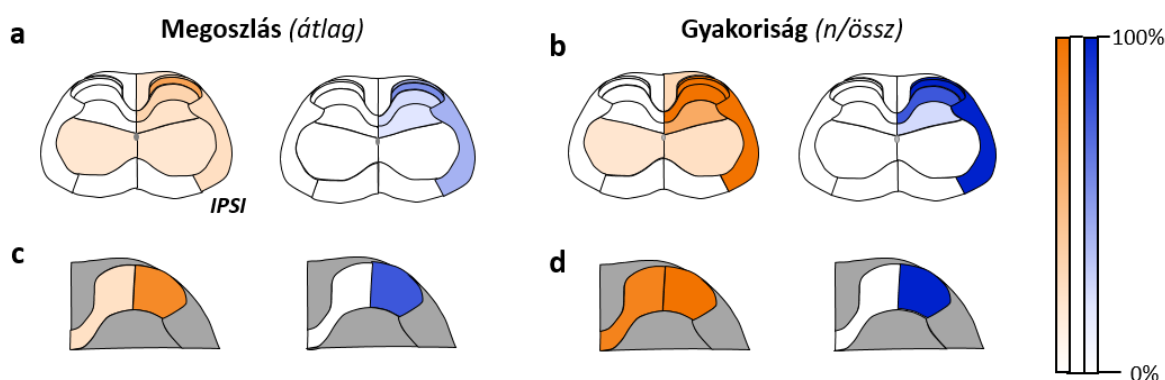
### 7.1.2.1 Interlamináris megoszlás

A 11. ábra két fő IN axontípust mutat be, amit jelen munkánk során el tudtunk különíteni. Az egyik esetben a sűrűn elágazó axonfelhő a szomatodendritikus tartományra centrált, elsősorban a saját közvetlen környezetét idegzi be (11. ábra, a). A másik variáns axonja a szomatodendritikus területtől medialisan is megjelent (11. ábra, b- c). Az axon mindhárom esetben a felszínes laminákra koncentrált, a medialisan betervedő axonsorozat neuronjai közül egy esetben még a funiculus posteriorban (DF) is tudtuk követni az axont (11. ábra, c-d). A medialis irányba terjedő axon látványos jelenséggé vált gyertyatartó-szerűen adott nyúlványokat a felszínes laminák irányába, ami morfológiáját tekintve emlékeztet a mélyebb laminákban végződő primer afferens ágak elágazódási mintázatára (Réthelyi és Szentágothai 1973).



12. ábra **Interlamináris axon- és dendritmegoszlás az IN-ok esetén az ipsilateralis oldalon.** Két eltérő mediolateralis axonhálózat- kiterjedéssel rendelkező IN (IN1- 11. ábra (a) és IN15 11. ábra (b)) nyúlványeloszlása a gv különböző régiókban. A kismértékben eltérő arányok ellenére mind az axon, mind a dendritek esetén azonosak a preferált régiók.

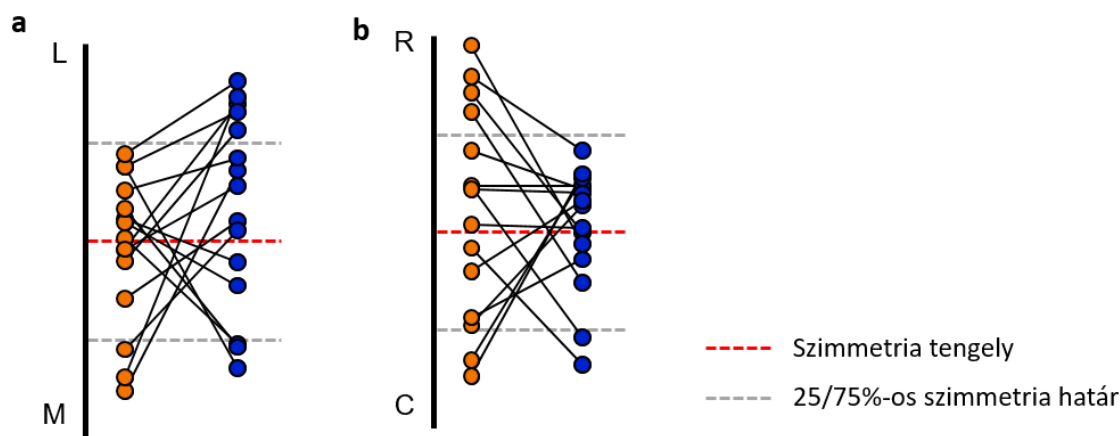
Ha a laminák szerinti axon- és dendritmegoszlást vizsgáljuk a 11. ábra a) és b) panelén bemutatott sejtek esetén (12. ábra), akkor azt tapasztaltuk, hogy annak ellenére, hogy a 11. ábra b) sejtje (IN15) jobban elterül és beterjed a medialis hátsó szarvi térrészbe, nyúlványaik mégis közel azonos területeken, az LI, LII, LIII-IV laminákban és a funiculus lateralis területén voltak megtalálhatóak. Ezek közül főként a II-es laminában találtunk nyúlványokat, ami jellemző volt a többi IN-ra is, hiszen mind nagy százalékban rendelkezett abban a térségben dendrittel és axonnal is (13. ábra). Valamint minden sejt esetén fellelhető volt valamennyi axon az I-es, III-IV-es laminában, valamint a DLF-ben és minimális mennyiségben az V-VI-os laminában. A contralateralis oldalra átlépő axonkollaterálist egyetlen esetben tudtunk megfigyelni. Ha a felszínes laminákban a dendrit és axonmegoszlásokat mediolateralis kiterjedésében vizsgáljuk (13. ábra c-d), akkor szembeötlő, hogy bár az elektrofiziológiai mérés technikai limitációjából adódó lateralis szóma-lokáció során a dendritek kizárólagos lateralis dominanciát mutattak, a 15 IN-ból 13 esetében mégis megtalálható volt változó mennyiségű (0,5-43,4%) axon a medialis hátsó szarvi szürkeállományban.



13. ábra **Szintérkép az IN nyúlványok interlamináris százalékos megoszlásának és megjelenési gyakoriságának áttekintéséhez.** (a-b) Az IN dendritek és axonok átlagos százalékos eloszlása nagymértékben hasonlónak bizonyult a felszínes laminákban. A nyúlványok mind százalékos megoszlásukban, mind előfordulási gyakoriságukban a felszínes laminákat (I-IV), továbbá az LF-t preferálták. (c-d) Az I-IV-es lamina medialis és lateralis oldalát összevetve feltűnő, hogy míg a dendritek lateralisán maradtak, addig az axonok az esetek 86,7%-ban a medialis hátsó szarv területén is megtalálhatóak voltak.

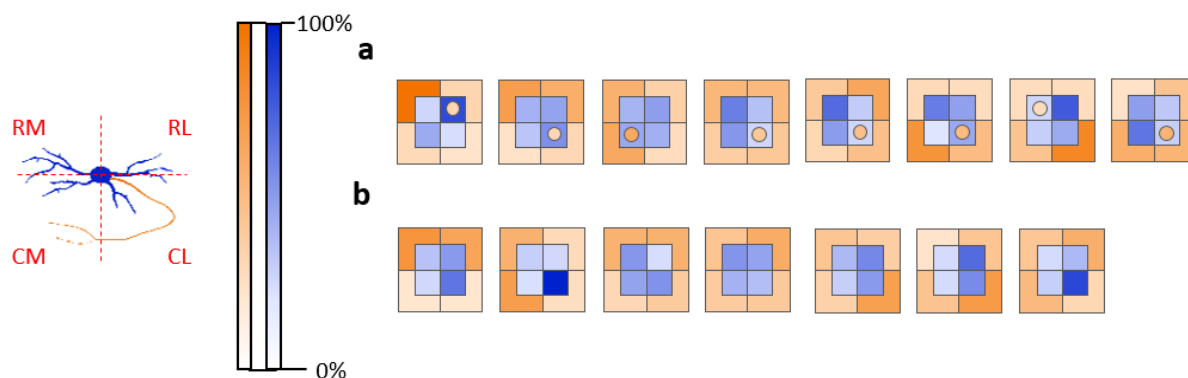
### 7.1.2.2 Sejtszimmetria

Az IN-ok dendritszimmetriája mind a mediolateralis, mind a rostrocaudalis irányban nagyon hasonló volt a PN-oknál megfigyeltékhez. A IN-ok 2/3-a rendelkezett dominánsan lateralis dendritfával ( $n=10$ ). Az axon rostrocaudalisán és mediolateralisan is diverz volt szimmetria tekintetében, ugyanakkor nagyobb arányban voltak az axon értékek a szimmetriatengely közelében (14. ábra). Egyértelmű korrelációt nem találtunk, megfigyelhető azonban egy tendencia, miszerint az adott oldali dendritdominancia értékhez egy, a szimmetriatengelyt keresztező vonallal kapcsolt ellenoldali dominanciát mutató axon érték tartozik (14. ábra).



14. ábra Az IN sejtek szimmetria vizsgálata mediolateralis és rostrocaudalis viszonylatban. (a) A vizsgált sejteket döntően lateralis dominanciával bíró dendritfák jellemezték. (b) Rostrocaudalisan a nyúlványok lokalizációja nagyobb diverzitást mutatott. Bizonyos sejtek közel azonos axonértékkel rendelkeztek, ezekben az esetekben az adatpontok takarják egymást.

Az IN-ok körüli, horizontális síkban kijelölt 4 térrészben történő nyúlvány-analízis (15. ábra) is megerősítette az IN-ek szimmetrikusabb, kevésbé polarizált megjelenését, mivel a homogénebb színű négyzetek alapján az IN-ok egyenletesebben fedik le a szóma körüli teret, mind dendritfájukat, mind pedig axonjukat tekintve. Az ellentétes oldali dendrit-/axondominancia jelzésértékűen mutatkozik meg ebben az analízisben. Az IN-ok esetében a dendritekből kiinduló axon nem preferálta a mediális dendriteket, mint a PN-ok esetében, viszont nagyobb számban eredtek ezek az axonok caudalis irányban eloszló dendritekből (15. ábra, a).



15. ábra **Az IN-ok nyúlványainak megoszlása a szómára centrált 4 térrészben horizontális síkban ábrázolva.** Sem a (a) dendrit eredetű axonnal bíró IN-ok, sem a (b) „klasszikus”, szomatikus eredetű axonnal rendelkező IN-ok nyúlványmegoszlása nem mutatott egyértelmű mintázatot. A nyúlványok megoszlása azonban egységesebb megjelenést mutatott, összehasonlítva a korábban látott PN-okénál (10. ábra), csak helyenként látható dominánsabb axon/dendrit jelenlét egy-egy térrészben.

Összegezve az IN-ok általában kevésbé polarizáltak, szimmetrikusabbnak bizonyultak a PN-oknál. A kisebb mértékű aszimmetria ugyanakkor gyakran ellentétes oldali axon- és dendriteloszlással társult.

3. táblázat Összefoglaló a dolgozatban felhasznált interneuronokról

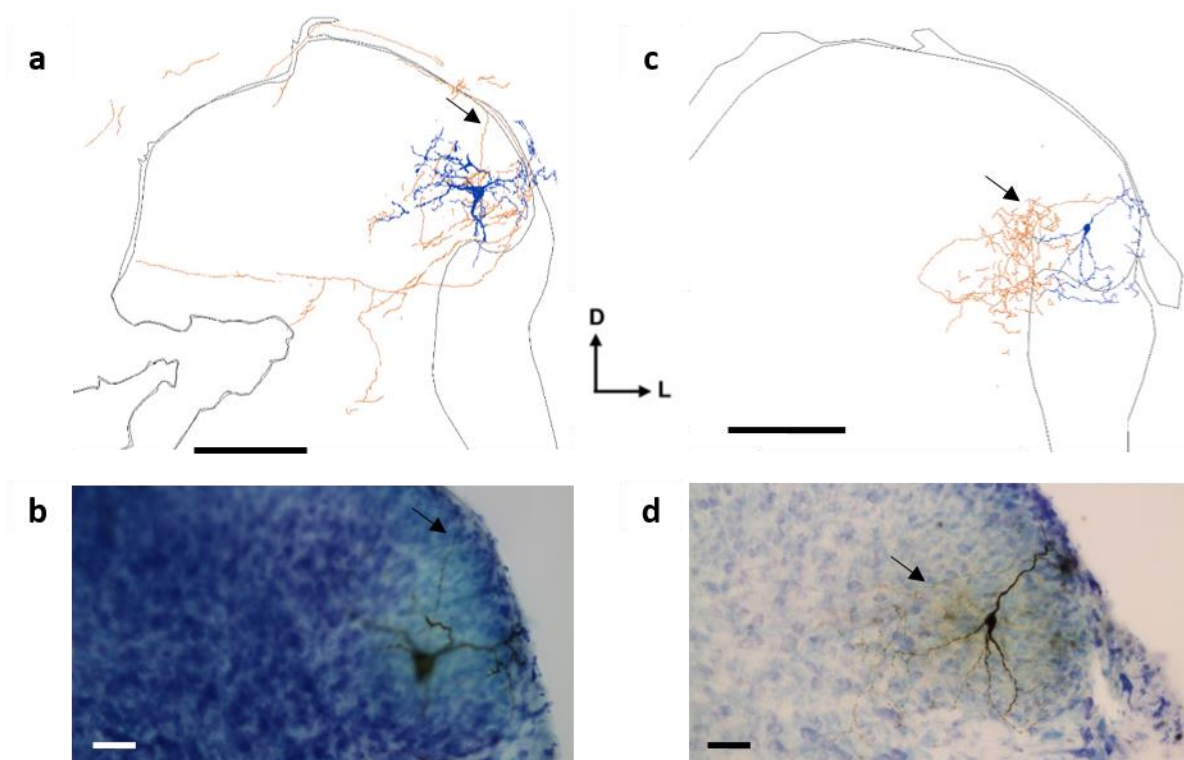
| <i>Sejtazonosító</i> | <i>szomatodendritikus morfológia<br/>(Lima és Coimbra 1986)</i> | <i>tüzelési mintázatot<br/>(Luz és mtsai.<br/>2014)</i> | <i>axoneredés</i> | <i>elsődleges<br/>dendritek száma</i> | <i>a dendrit 50%-a a DLF-<br/>ben helyezkedik el</i> | <i>rekonstrukció</i> |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------|---------------------------------------|------------------------------------------------------|----------------------|
| IN1                  | multipolaris                                                    | tónusos                                                 | szóma             | 5                                     | nem                                                  | 11. ábra, a          |
| IN2                  | multipolaris                                                    | tónusos                                                 | dendrit           | 7                                     | nem                                                  |                      |
| IN3                  | multipolaris                                                    | ritmikus                                                | dendrit           | 7                                     | igen                                                 |                      |
| IN4                  | multipolaris                                                    | ritmikus                                                | dendrit           | 4                                     | igen                                                 |                      |
| IN5                  | ellaposodott                                                    | tónusos                                                 | szóma             | 4                                     | igen                                                 | 11. ábra, c          |
| IN6                  | ellaposodott                                                    | nem ismert                                              | dendrit           | 4                                     | nem                                                  |                      |
| IN7                  | multipolaris                                                    | ritmikus                                                | dendrit           | 6                                     | nem                                                  |                      |
| IN8                  | multipolaris                                                    | ritmikus                                                | szóma             | 7                                     | nem                                                  |                      |
| IN9                  | multipolaris                                                    | nem ismert                                              | dendrit           | 8                                     | igen                                                 |                      |
| IN10                 | multipolaris                                                    | tónusos                                                 | dendrit           | 7                                     | nem                                                  |                      |
| IN11                 | multipolaris                                                    | tónusos                                                 | szóma             | 6                                     | igen                                                 |                      |
| IN12                 | fuziformis                                                      | "gap"                                                   | szóma             | 5                                     | nem                                                  |                      |
| IN13                 | multipolaris                                                    | ritmikus                                                | szóma             | 6                                     | nem                                                  |                      |
| IN14                 | multipolaris                                                    | tónusos                                                 | szóma             | 6                                     | nem                                                  |                      |
| IN15                 | multipolaris                                                    | "gap"                                                   | dendrit           | 5                                     | nem                                                  | 11. ábra, b          |

## **7.2 III-AS LAMINA SEJTEK**

### **7.2.1 Antenna sejtek**

Az I-es lamina sejteinek kvantitatív morfológiai vizsgálatát főként abból a célból végeztük el, hogy a struktúra részletes feltárásával a neuroncsoportok funkcionális sajátosságaira tudjunk következtetni. A felhasznált, részben általunk kidolgozott új módszerek ugyanakkor egy olyan korábbi munka során kerültek kidolgozásra, mikor egy funkcionális lelet anatómiai alátámasztását végeztük el a III-as lamina sejtein. Elektrofiziológiai mérések azt sugallták, hogy vannak olyan A $\beta$  és A $\delta$  alacsony küszöbű primer afferensektől bemenetet fogadó III-as lamina sejtek, amelyek axonjaikkal elérik az I-II-es laminát, ahol monoszynaptikus kapcsolatokat létesítve modulálják a helyi ingerület-áttevődést (Luz és mtsai. 2014). Ennek az útvonalnak az igazolásához a III-as lamina sejtek, ezen belül is az antenna típusú (ANT) sejtek primer afferens bemenetének szisztematikus vizsgálatát (a diszkusszióban kerül bemutatásra a 8.4.2. fejezetben), valamint, saját munkámként azok axon és dendrit nyúlványrendszerének kvantitatív elemzését végeztük el.

Ezen sejtek sajátos morfológiai jellemzője, hogy nagy dorsoventralis kiterjedésű dendritfával rendelkeznek, jellemzően egy dorsalisán a hátsó szarv felszíne felé felnyúló dendrittel, amitől a sejt a kérgi piramissejtekhez hasonló szomatodendritikus megjelenéssel bírnak. Ez a morfológiai sajátosság volt a kiválasztási kritérium ennek a sejtcsoportnak az analízisének (4. táblázat). A példaként bemutatott sejtek esetében (16. ábra) is jól kivehető a dorsalis irányú dendrit, míg a többi a III-IV-es laminákban helyezkednek el a szoma környezetében.

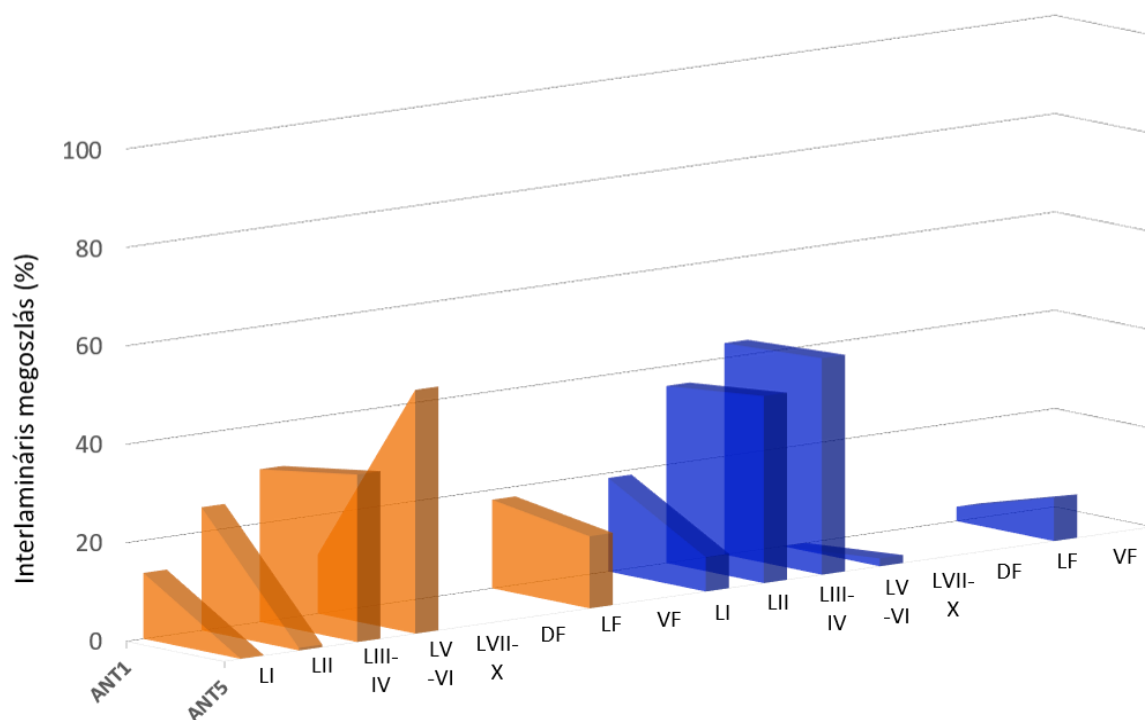


16. ábra **Tipikus antenna sejtek**. Mindkét sejt esetében megtalálható egy, a dorsalis felszín felé húzódó, majd ott elágazó dendrit. A két sejtest méretbeli különbségén túl az egyik esetben (a-b) az axon egy része szintén felnyúlik az I-II-es laminába (ANT1), míg a másik bemutatott sejt (c-d) axonja túlnyomórészt a III-IV-es laminára koncentrálódik a sejt többi dendritjének közelében, az I-es laminában azonban nem rendelkezett axonnal (ANT5). A vizsgált neuronok egyikénél sem találtunk olyan főaxonnak tűnő ágat, amely átlépett a contralateralis oldalra. Megjegyzendő, hogy az ANT1 jelű sejt (a-b) esetében a felpuffadt megjelenés az elektrofiziológiai mérés következtében megjelenő artefaktum. Az ábrán nyíl jelöli az axont. Lépték: 250  $\mu$ m (a,c) és 100  $\mu$ m (b,d).

#### 7.2.1.1 Interlamináris megoszlás

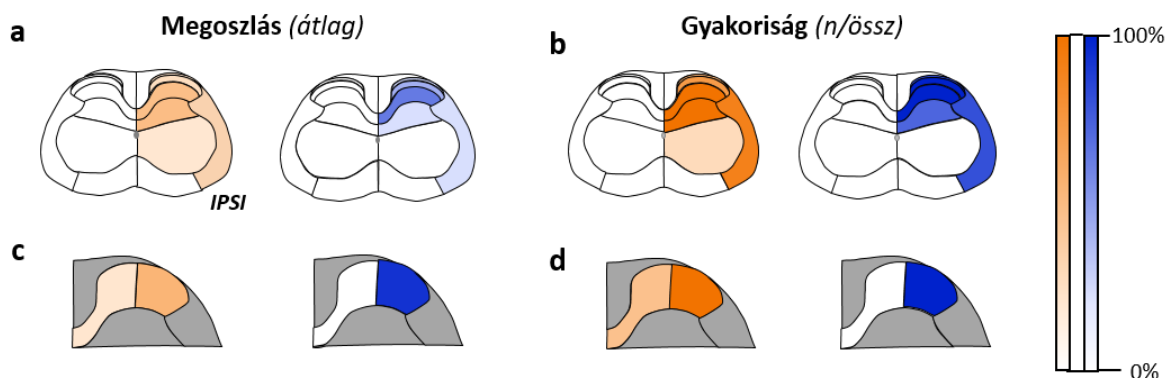
A 16. ábrán példaként bemutatott két ANT sejt nyúlványeloszlását laminánként megvizsgálva a dendritek, bár eltérő mennyiségben, de ugyanazokat a laminákat preferálják. Az axonok esetében azonban két elkülönülő mintázatot mutat a két sejt. Míg a III-IV és V-VI laminákban mindkét sejt rendelkezik axonnal, addig a felszínes I-II-es laminákba csak az ANT1 jelű sejt küld axonokat (17. ábra). Akárcsak a PN-ok és az IN-ok esetében, a DLF területén is találtunk axonokat, de lényegesen kisebb arányban és gyakorisággal, mint az I-es lamina sejtjeinek esetében (18. ábra).

### ANT1 és ANT5 axon- és dendritmegoszlás ipsilateralisan



17. ábra **Axon- és dendritmennyiségek régiónkénti megoszlása a 16. ábrán bemutatott ANT sejtek esetében.** A dendritek esetén közel hasonló eloszlás figyelhető meg, ugyanakkor az axonok esetében a mélyebb laminákon túl az egyik sejt esetében igen, míg a másikonál nem figyelhetők meg kollaterálisok a felszínes laminákban.

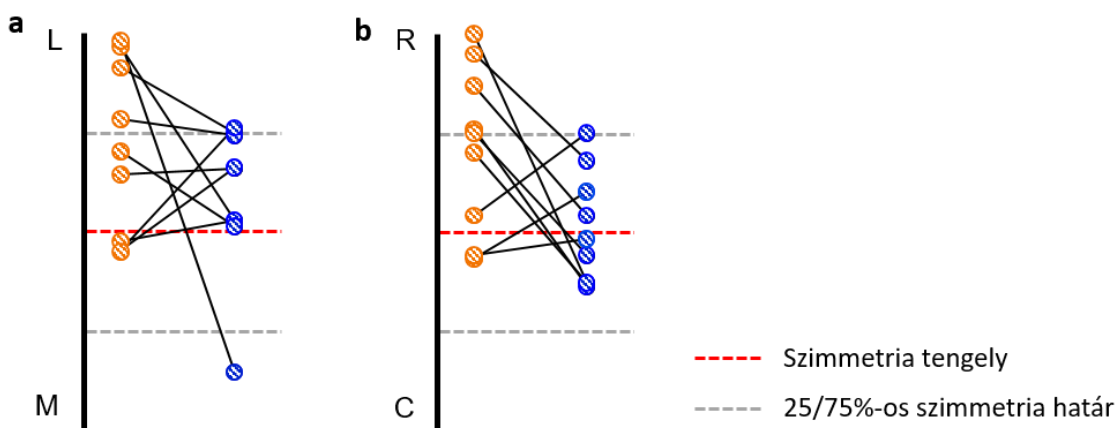
Az ANT dendritek interlamináris megoszlásának és gyakoriságának kvantitatív analízise a sejtek morfológiájával egybecsengő eredményt mutatott. A kiemelten preferált laminák az I-es, III-IV-es voltak, de kisebb mennyiségben a mélyebb laminákban és a DLF-ben is előfordultak dendritdarabok. A II-es laminán keresztülhúzó dendritek miatt az előfordulási gyakoriság térképen ez a lamina is 100%-osan szerepel, de a megoszlási értékek itt valójában alacsonyok. Az axon megoszlás is a mélyebb laminákban magasabb, illetve az I-es laminába ágakat adó sejtek miatt abban a laminában is magasabb az átlagos megoszlási érték. Kiemelendő, hogy mind a dendritek, mind az axon tekintetében a hátsó szarv laterális fele az, ahol a nyúlványok koncentrálnak (18. ábra), a 9 ANT közül mindössze 3 esetben találtunk minimális arányú axonszakaszt, ami a medialis irányba terjedt ki (0,4-9,5%-ig).



18. ábra **Szintérkép az ANT nyúlványok interlamináris százalékos megoszlásának és megjelenési gyakoriságának áttekintéséhez.** (a) Az axon esetén a legtöbb nyúlványt a III-VI-os laminában találtuk, míg a dendritek esetén ez főként a III-IV-es lamina környékére, továbbá a dorsalis nyúlvány miatt az I-es laminára összpontosul. (b) Az axon és dendrit előfordulási gyakorisága hasonló mintázatot mutat aII-es lamina kivételével, ahol a dendritek az áthaladás miatt minden esetben előfordulnak, viszont nem minden axon adott ide kollaterálist. (c-d) Az I-IV-es laminában az axon- és dendrithálózat (lateralis sejtestből kiindulva) főként lateralisan terül el.

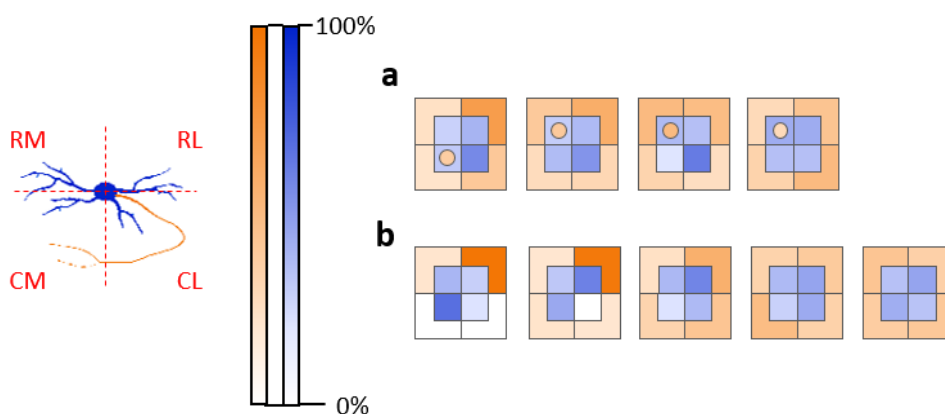
#### 7.2.1.2 Sejtszimmetria

A számára, mint középpontra viszonyított szimmetria-analízis az ANT sejteknél mutatta a legeggyötetűbb aszimmetriát, különösen az axonok tekintetében. Dominánsan laterális és rostralis megoszlást mutattak, míg a dendritek, egy kiugró eset kivételével, szimmetrikusabb elrendeződésűnek bizonyultak mindkét tengely mentén (19. ábra).



19. ábra **Az ANT sejtek szimmetria vizsgálata mediolateralis és rostrocaudalis viszonylatban.** A vizsgált sejtek inkább laterális (a), valamint döntően rostralis (b) aszimmetriát mutattak az axonmegoszlás tekintetében, míg a dendritek mindkét tengely mentén szimmetrikusabb elrendeződést mutattak.

A szómára centrált horizontális síkban vizsgált eloszlás, bár viszonylag homogén, de szintén tükrözte a rostralis és lateralis dominanciát. Érdekes megfigyelés volt továbbá, hogy az ANT sejtek dendritikus eredetű axonjai minden esetben medialis irányban elhelyezkedő dendritből eredtek (20. ábra).



20. ábra **Az ANT sejtek nyúlványainak megoszlása a szómára centrált 4 térrészben horizontális síkban ábrázolva.** (a) Dendrit eredetű axonnal bíró ANT sejtek esetében kizárólag medialisan elhelyezkedő dendritekből eredt axon. (b) A szomatikus eredetű axonnal rendelkező ANT sejtek két esetben jelentősen polarizáltabb nyúlványmegoszlást mutattak.

Összegezve elmondhatjuk, hogy az ANT sejtek kiválasztásához használt dendritmorfológiai kritérium alapján várható egységes dendritparaméterek mellett az axonok 2 elkülönülő axonmegoszlási mintázatot mutattak: egyes esetekben az axonágak elérték az I-es laminát (n=4), míg a többi (n=5) esetben az axon főként a III-IV-es laminákban, valamint a DLF-ben helyezkedett el.

4. táblázat **Összefoglaló a dolgozatban felhasznált antenna sejtekről**

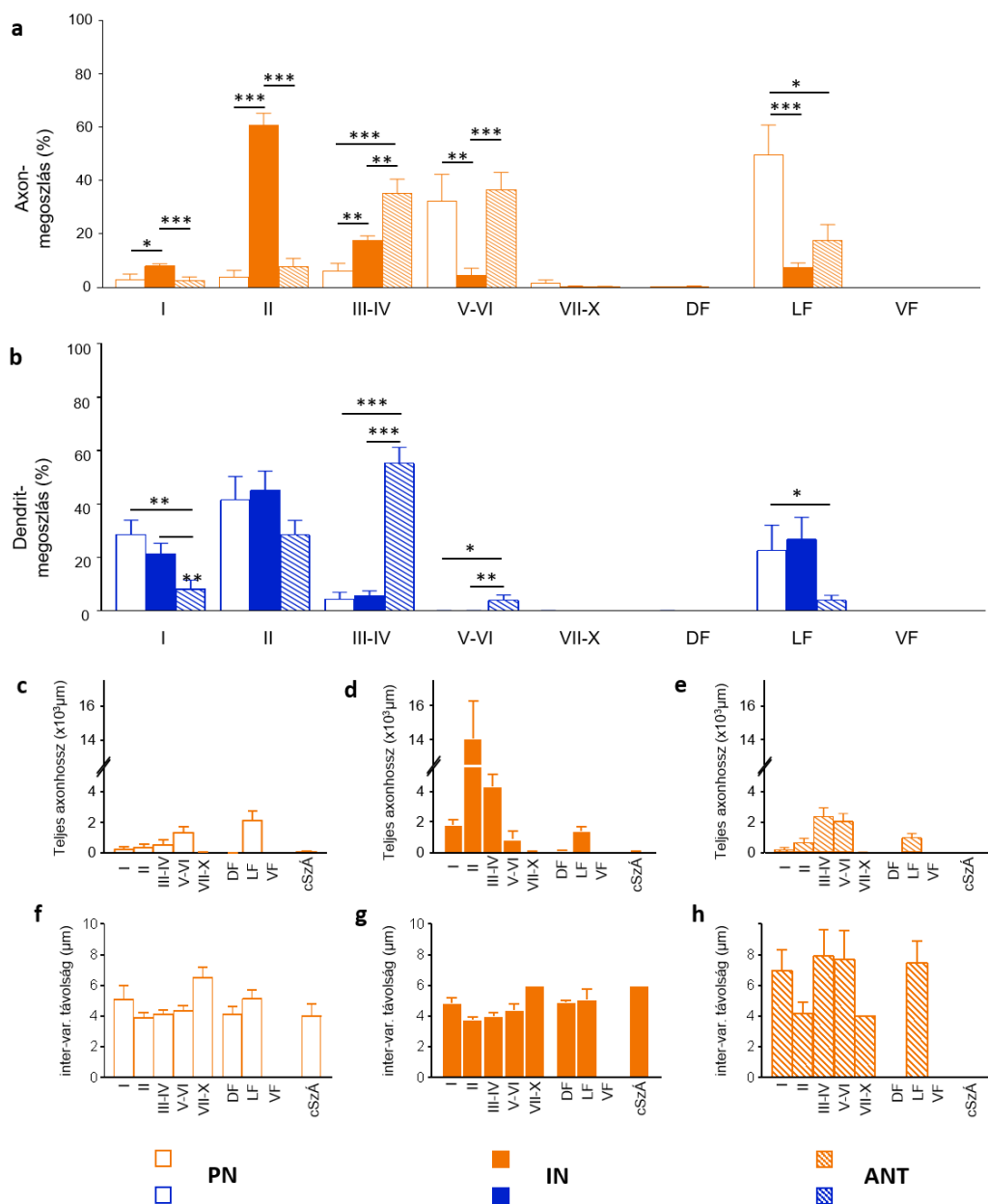
| <b>Sejtazonosító</b> | <b>tüzelési mintázat</b><br>(Luz és mtsai. 2014) | <b>axoneredés</b> | <b>elsődleges dendritek száma</b> | <b>a dendrit 50%-a a DLF-ben helyezkedik el</b> | <b>rekonstrukció</b> |
|----------------------|--------------------------------------------------|-------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------|
| <b>ANT1</b>          | tónusos                                          | szóma             | 5                                 | nem                                             | 16. ábra, a          |
| <b>ANT2</b>          | tónusos                                          | dendrit           | 7                                 | nem                                             |                      |
| <b>ANT3</b>          | tónusos                                          | szóma             | 5                                 | nem                                             |                      |
| <b>ANT4</b>          | késleltetett                                     | dendrit           | 3                                 | nem                                             |                      |
| <b>ANT5</b>          | tónusos                                          | dendrit           | 4                                 | nem                                             | 16. ábra, b          |
| <b>ANT6</b>          | késleltetett                                     | szóma             | 3                                 | nem                                             |                      |
| <b>ANT7</b>          | késleltetett                                     | szóma             | 3                                 | igen                                            |                      |
| <b>ANT8</b>          | ritmikus                                         | dendrit           | 5                                 | nem                                             |                      |
| <b>ANT9</b>          | ritmikus                                         | szóma             | 5                                 | nem                                             |                      |

### 7.3 A VIZSGÁLT SEJTCSOPORTOK (PN, IN, ANT) ÖSSZEHAISONLÍTÓ ELEMZÉSE

Bár az előző fejezetekben bemutatott I-es és III-as laminában található neuronjaira kifejezett morfológiai diverzitás volt jellemző sejtcsoportjaikon belül, volt pár karakterisztikusan megjelenő tulajdonság, amik eltérővé tették ezeket a sejtcsoportokat. Emiatt fontosnak tartottuk a három vizsgált neuronpopuláció egymással való összehasonlítását, a korábban vizsgált paraméterek tekintetében.

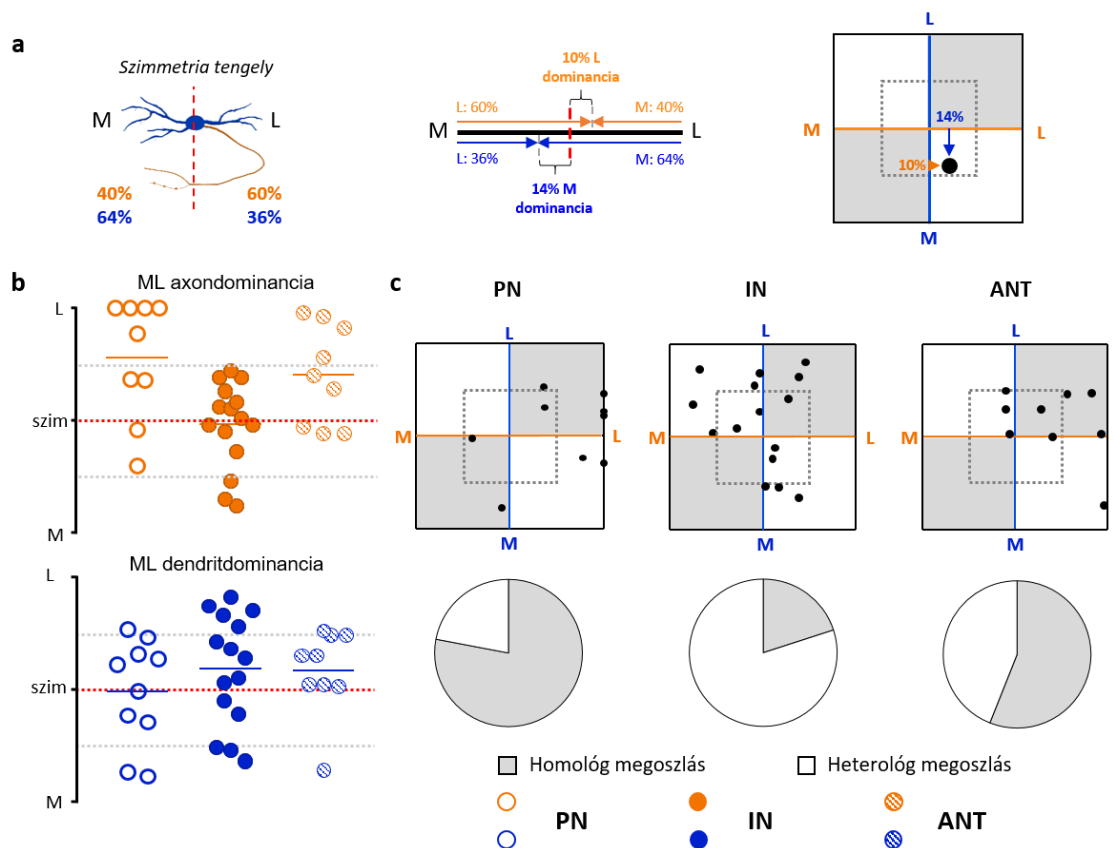
A lamináris megoszlások összehasonlítása alapján a PN-ok inkább a mélyebb laminákban adnak axonkollaterálisokat (V-VI), míg az IN-ok és ANT sejtek axonjai főként felszínesen (I-IV) maradnak. A DLF dorsalis része mindhárom sejtcsoportnál jellemző célpont volt (21. ábra, a). A teljes axonhossz az IN-ok esetében volt a legnagyobb, közel háromszorosa a PN és ANT sejtek kevésbé kiterjedt axonhálózata esetében mérttel (21. ábra, c-e). Az axonvarikozitások megoszlása közel azonos volt minden laminában, kivételt ez alól csak az ANT sejtek képeztek, ahol volt néhány kiugróbb érték, elsősorban azokban a laminákban, ahol az axon nagyobb százalékban volt fellelhető (21. ábra, f-h). Contralateralisan elhelyezkedő axonkollaterálisokat nagyobb számban a PN sejtek esetén láttunk ( $n=3$ , míg 2 további esetben az axon megindult abba az irányba). Az IN esetén egy esetben találtunk kereszteződést, míg az ANT sejteknél egy sejt axonja megközelítette a középvonalat, de nem lépte azt át.

A három neuroncsoport dendritjeinek százalékos megoszlása a szómák elhelyezkedése alapján a várt laminákra koncentrált. Ez a PN-ok és IN-ok esetén főként az I-es, II-es laminát, valamint a DLF-et jelentette, míg az ANT sejtek inkább a II-III-as laminákat foglalták el (21. ábra, b). Az összdendrithossz az IN-ok és ANT sejtek esetében hasonló volt (átlag  $_{IN}= 3192,5 \pm 372,4$ , valamint átlag  $_{ANT}= 2991,6 \pm 371,3 \mu m$ ), míg a PN-ok dendrithosszúsága ennél valamennyivel hosszabbnak bizonyult (átlag  $_{PN}= 3967,1 \pm 518,2 \mu m$ ), azonban rostrocaudalisan az antenna sejtek látszólag nagyobb területet fedhetnek le (5. táblázat a 8. fejezetben).



21. ábra **Interlamináris nyúlvány- és varikozitásmegoszlások összehasonlítása a vizsgált neurontípusok között.** (a) Az axon százalékos megoszlása a vizsgált régiókban belül ipsilateralisan. A vizsgált típusoknál eltérő régiókat preferált az axonhálózat. (b) A dendritfa százalékos megoszlása különböző laminákban belül. Az IN és PN dendritjeinek eloszlása nagyon hasonló, főként az I-II-es laminában, valamint a DLF-ben helyezkednek el. Ezzel szemben az ANT dendritjei főként a II-IV-es laminában dominálnak. (c-e) Az elemzett sejtek axonjainak teljes hossza. Megjegyzendő, hogy az IN-oknál majdnem háromszor több axont tudtunk nyomon követni, mint a másik két sejtípus esetén. (f-h) A sejtek varikozitás sűrűsége az IN és PN esetében közel azonos, míg az ANT sejtek ritkábban elhelyezkedő varikozitásokat tartalmaztak. Statisztikai próba: Mann-Whitney teszt: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . cSzÁ; contralateralis szürkeállomány

A szómára centrált mediolateralis és rostrocaudalis irányokban vizsgált szimmetriát tekintve, mind az IN-ok, mind az ANT sejtek szimmetrikusabbnak bizonyultak (közelebb a szimmetria középponthoz - hasonló mennyiségű dendrit/axon mindkét irányban), mint a PN csoport sejtjei (22-23. ábra).

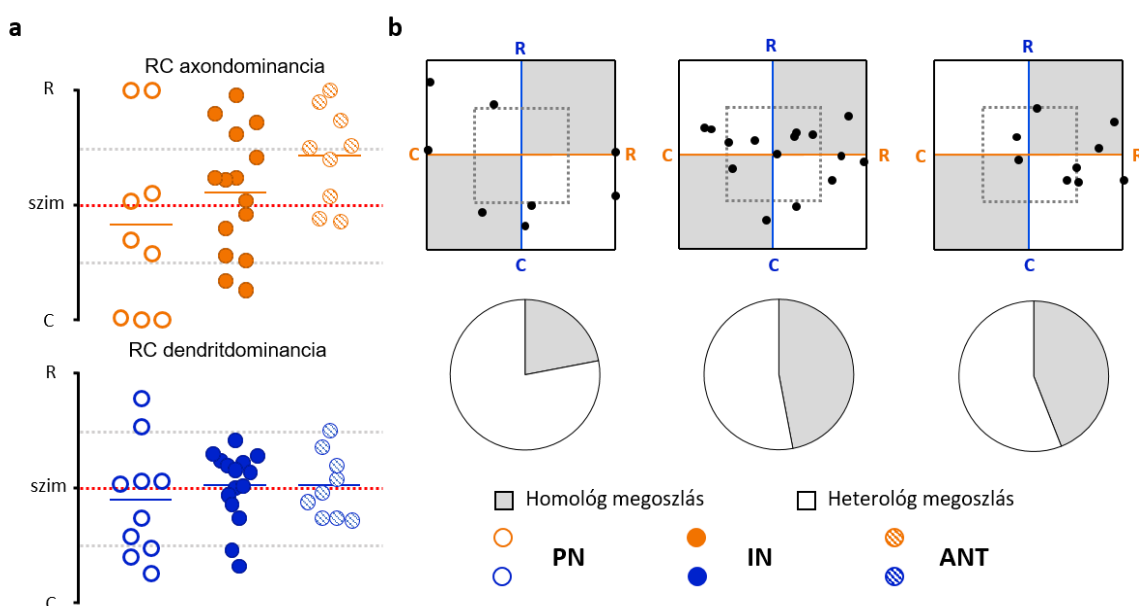


22. ábra **A vizsgált sejtcsoportok szimmetrianalízise mediolateralis irányban.** (a) A dendrit- és axonszimmetria közös koordináta-rendszerben való bemutatásának sematikus ábrája. A dominancia-érték leolvasásának módja megegyezik a 9. ábrarésznel ismertetettel, azzal a különbséggel, hogy az adott sejt elhelyezkedésének X-koordinátáját az axondominancia-érték, míg az Y-koordinátát a dendritdominancia-érték adja meg. Ebben az ábrázolásban amennyiben egy sejt dendritje és axonja azonos mennyiségben van jelen a vizsgált irányban a sejt két oldalán, akkor a pont az origóra fog esni. A példaként bemutatott sejt dendritjei 14%-os medialis, míg axonja 10%-os laterális dominanciát mutat. (b) Axon- és dendritdominancia a szómára vetített szimmetria-tengelyre (szim) vonatkoztatva mediolateralisan. (c) Mediolateralis szóma körüli megoszlás tekintetében a PN-ok főként homológ (dendrit és axon azonos irányú dominanciája), míg az IN-ok inkább heterológ (axon és dendrit ellentétes irányú dominanciája) megoszlást mutatnak. Az ANT sejteknél a heterológ és homológ dominancia közel azonos arányban van jelen, és az értékek általában közelebb esnek az origóhoz, ezért ezeket a sejteket szimmetrikusabbnak tekinthetők. Ezzel ellentétben a PN-ok és IN-ok nagyobb arányban mutattak az origótól távolabb eső értékeket.

A mediolateralis irányban (22. ábra) a PN-ok és ANT-ok gyakrabban mutattak azonos irányú dominanciát dendritjeik és axonjuk tekintetében (ún. homológ megoszlás: pl. laterális dendritdominanciához társuló laterális axondominancia). Az IN-ok esetében mediolateralis

irányban a heterológ megoszlás volt a jellemző, azaz a dendritdominancia oldalához képest az ellenoldalon domináló axon. A projekciós neuronok esetén sokszor találtunk olyan esetet, ahol az axonkollaterálisok kizárólagosan az egyik térfélben helyezkedtek el. A lateralisán elhelyezkedő ANT és PN sejteknél a szóma helyzete a nyúlványrendszer dominánsan laterális elhelyezkedésével társult, az IN-ok esetében ez a tendencia nem volt megfigyelhető, a nyúlványok mind medialisan, mind lateralisán hasonló arányban domináltak (22. ábra, b-c).

Rostrocaudalis irányban (23. ábra) rostralis preferencia volt felfedezhető az ANT sejtek esetében. A rostrocaudalisán inkább heterológ eloszlást mutató polarizáltabb (kifejezetten rostralis vagy caudalis dominancia) PN-ok hasonló mértékben mutattak rostralis és caudalis preferenciát. Az IN-ok ebben az irányban is homogénebb, változatos dominancia értékeket mutattak.



23. ábra **A vizsgált sejtcsoportok szimmetrianalízise rostrocaudalis irányban.** A dendrit- és axonszimmetria ábrázolásának mikéntje RC irányban megegyezik az előző ábra során bemutatottal. (a-b) RC irányban a PN-ok heterológ megoszlást mutattak, valamint kifejezett aszimmetriát, míg az IN-ok és ANT sejtek szimmetrikusabbak voltak és közel azonos mértékben volt heterológ és homológ a megoszlásuk.

A sejtek szimmetria-értékei nem mutattak összefüggést sem azok tüzelési mintázatával, sem pedig szomatodendritikus morfológiai beosztásukkal, ezért ezeket az analíziseket jelen munkában nem mutatom be (3. ábra, Kókai és mtsai. 2022).

## 8 MEGBESZÉLÉS

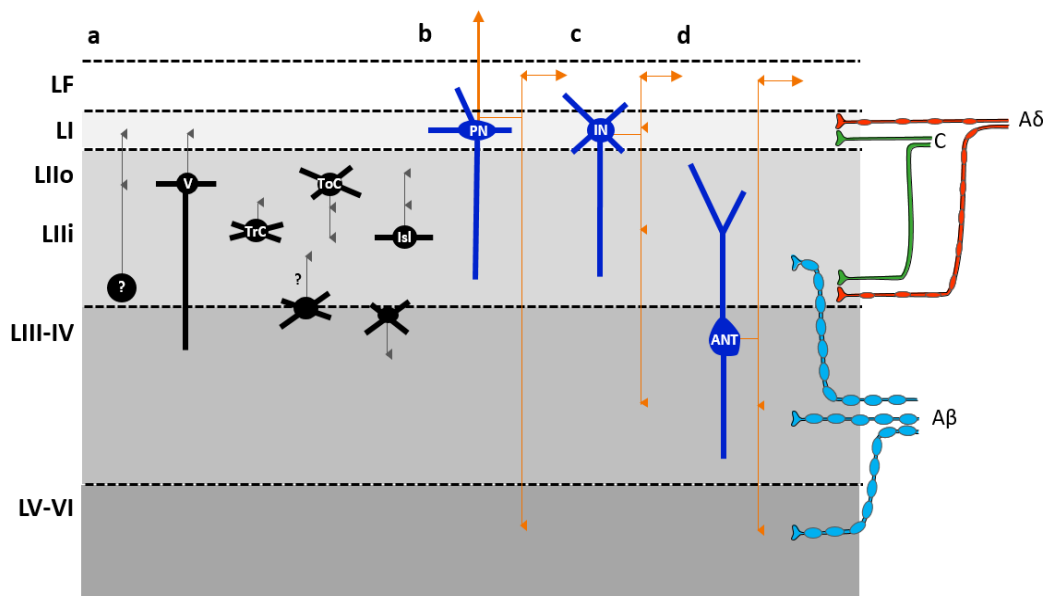
---

Jelen dolgozatban bemutatott munkám során 34, teljes sejt patch-clamp technikával jelölt neuron 3D rekonstrukcióját végeztük el fiatal patkány gerincvelőjének lumbalis szakaszán. Célunk azon finom anatómiai különbségek feltárása volt, amik pusztán a sejt szomatodendritikus megjelenéséből nem egyértelműek, ugyanakkor meghatározóak lehetnek a sejt hálózati szerepe szempontjából. Ilyen paraméternek tekintettük a dendritek és axonok lamináris eloszlását a sejtesthez viszonyított helyzetét, amik a neuronok bemeneteit és célpontjait nagymértékben meghatározzák.

Elemzéseinkhez az elektrofiziológiai mérések során biocytinnel jelölt neuronokat használtunk, amiket portugál kollaborációs partnerünk bocsátott a rendelkezésünkre; korábban az itt felhasznált sejtek morfológiai elemzésére nem került sor. Jelen munkában az I-es lamina projekciós (n= 10) és interneuronjait (n= 15), valamint a III-as lamina antenna sejtjeit (n= 9) vizsgáltuk. Az eltérő analizált esetszámok részben az eredeti munkák eltérő esetszámából adódnak, részben pedig abból a tényből, hogy nem minden előhívott sejt felelt meg az analíziseinkhez szükséges feltételeknek. Megjegyzendő, hogy a morfológiai vizsgálatra használt sejteket eredményező elektrofiziológiai mérésekben nem vettem részt (továbbá a témavezetőm által elvégzett kísérletsorozat során sem), ugyanakkor ezen eredmények ismertetése elengedhetetlen lenne morfológiai eredményeink értelmezéséhez, ezért ezek ebben a fejezetben kerülnek bemutatásra.

Az alábbi főbb morfológiai különbségeket és sajátosságokat tártuk fel jelen munka során: (1) a projekciós neuronok axonkollaterális mintázata egy dorsoventralis irányú információáramlást sugall (24. ábra, b), míg (2) az interneuronok axonja ezzel szemben inkább a lateromedialis információáramlást segítheti. (3) Az antenna sejtek kompaktabb megjelenéssel rendelkeztek, mint a másik 2 vizsgált típus. Esetükben az axon vizsgálata feltárta, hogy (4) rendelkezhetnek az I-es laminát elérő axonhálózattal. Végezetül (5) mindhárom sejt rendelkezett bizonyos mennyiségű axonnal a funiculus lateralis-ban (az I-es lamina esetében mindnek; 24. ábra, b-d). Utóbbi megfigyelés megerősíti munkacsoportunk az I-es lamina sejtek esetében tett korábbi eredményeit (Szücs és mtsai. 2010 és 2013., Antal és mtsai. 2016). A funiculus lateralisban található kollaterálisok (amik szinte kizárólag a DLF területén voltak jelen) helyi információkat továbbíthatnak a szomszédos szegmentumokba, valamint a nucleus spinalis laterisba (Wall és mtsai. 1999; Szücs és mtsai. 2013). Antal és mtsai. (2016) közleményükben erőteljes poliszinaptikus gerjesztést értek tetten a DLF régiójában

preszinaptikus I-es lamina projekciós sejt stimulálását követően. Úgy vélték, hogy a jelenség mögött egy olyan serkentő interneuronokból álló hálózat állhat, ami a „feedforward” serkentésen keresztül felerősíti és tovább küldi a projekciós neuron aktivitását.



Cordero-Erausquin és mtsai. 2016 módosítva Klausberger és Somogyi 2008 alapján  
kiegészítve Todd, 2010 nyomán és a dolgozatban bemutatott eredményekkel

24. ábra **A felszínes laminákban ismert és az általunk feltárt kapcsolatrendszer sematikus összefoglalása.** (a) A felszínes hátsó szarv (I-III-as lamina) sejtjeinek korábban leírt sematikus hálózatai (Cordero-Erausquin és mtsai. 2016 eredeti ábrája alapján Klausberger és Somogyi 2008 sémájához hasonlóan módosítva, kiegészítve Todd 2010 nyomán). Ennek a panelnek a részletesebb ismertetése a 4.4. fejezetben megtörtént (2. ábra). (b) Korábbi (Antal és mtsai. 2016; Szücs és mtsai. 2010) és jelen eredményeink egy sokkal kiterjedtebb lokális kapcsolatrendszert tártak fel a PN-ok esetében. A kollaterális típusoknak megfelelően a nagyon felszínes és a mély laminák felé, valamint az LF területén létesíthetnek főként kapcsolatokat. (c) Az IN-ok a hátsó szarv I-IV lamináin belül rendelkezik gazdag kapcsolatrendszerrel, míg az (d) ANT sejtek kapcsán egy a PN-ok fordított axoneloszlási mintázata figyelhető meg: lokális kapcsolatok a szoma környezetében, illetve felszín irányába adott kapcsolatokon keresztüli információáramlás. A narancssárga háromszögek jelzik azokat a régiókat, ahol a vizsgált sejtek többségében (a vizsgált esetek több mint 80%-ánál) volt jelen axon. Az LF-ben található vékony nyíl a feltételezett propriospinalis kapcsolatokat hivatott jelezni. A vastag nyíl a (b) panelen a főaxont jelöli. A dendritek ott kerültek feltüntetésre, ahol csoporton belül minden esetben fellelhető volt dendritszakasz. A LF elhelyezése az ábra átláthatósága miatt került az ábra felső részébe.

Összességében elmondható, hogy fontos lehet az itt bemutatott kvantitatív morfológiai elemzésekből származó hasonló eredmények összevetése a funkcionális adatokkal, további, eddig ismeretlen neuronális funkciók felderítésében. Későbbi terveink között szerepeltek az itt elvégzett elemzések kiterjesztése különböző neuronpopulációkra, amelyek esetleg feltárhatnak olyan korrelációkat, amik akár megjósolhatják fejlődéstani eredetüket, akár hálózati szerepüket.

## 8.1 TECHNIKAI MEGFONTOLÁSOK

Bár az elektrofiziológiai elvezetések intakt gerincvelői blokkpreparátumban végezték, az esetek 73,5%-ban az axon kilépett a blokk egyik vagy mindkét oldalán (5. táblázat), emiatt munkám elsősorban a mediolateralis és interlamináris eloszlásokra fókuszált és a rostrocaudalis kiterjedés mértékéről csak minden bizonnyal alulbecsült, megközelítő értékeket közlünk (5. táblázat). Továbbá, bár jelentős hangsúlyt fektettünk a lehető legjobb töltéssel rendelkező sejtek kiválasztására, nem mindegyik jelölés volt egyforma, a követhetőség pedig ennek függvényében kismértékben változhatott.

Fitzgerald munkatársaival több ízben is bizonyította (Fitzgerald 1987 (a) és (b), Beggs és mtsai. 2002), hogy a primer afferens bemenetek kapcsolatai változnak patkányban a kor előrehaladtával. A mért és jelölt neuronjaink fiatal, 9-20 napos patkányokból származnak, mivel az előrehaladott myelinizáció miatt az intakt patkány gerincvelőn végzett patch-clamp méréseket idős állatokban nehéz kivitelezni. Eredményeink interpretációjánál tehát azt is figyelembe kell venni, hogy egyes morfológiai megfigyeléseink, különösen a mediolateralis nyúlványeloszlásra vonatkozóak a kismértékben reorganizálódó primer afferens bemenetek anatómiai hatásai miatt változhatnak. Ezen túlmenően, a felszínes laminák laterálisan könnyebben megközelíthetőek ennél a technikánál, emiatt a mérések és következményesen a jelölt sejtek elhelyezkedése is döntően laterális (Szücs és mtsai. 2009).

5. táblázat **Összefoglaló a dolgozatban felhasznált sejtek rostrocaudalis kiterjedéséről**

| I-es lamina |                     |         |             |                     |         | III-as lamina |                     |         |  |
|-------------|---------------------|---------|-------------|---------------------|---------|---------------|---------------------|---------|--|
| Projekciós  | RC kiterjedése (µm) |         | Interneuron | RC kiterjedése (µm) |         | Antenna       | RC kiterjedése (µm) |         |  |
|             | axon                | dendrit |             | axon                | dendrit |               | axon                | dendrit |  |
| <i>PN1</i>  | 2000                | 600     | <i>IN1</i>  | ≥2800               | 400     | <i>ANT1</i>   | 1400                | 700     |  |
| <i>PN2</i>  | ≥2300               | 500     | <i>IN2</i>  | 2000                | 500     | <i>ANT2</i>   | 1800                | 400     |  |
| <i>PN3</i>  | 600                 | 400     | <i>IN3</i>  | 2300                | 600     | <i>ANT3</i>   | ≥2700               | 400     |  |
| <i>PN4</i>  | 500                 | 500     | <i>IN4</i>  | ≥2400               | 400     | <i>ANT4</i>   | ≥1100               | 700     |  |
| <i>PN5</i>  | ≥700                | 400     | <i>IN5</i>  | ≥2200               | 400     | <i>ANT5</i>   | ≥1500               | 300     |  |
| <i>PN6</i>  | ≥1300               | 600     | <i>IN6</i>  | 700                 | 200     | <i>ANT6</i>   | ≥500                | 400     |  |
| <i>PN7</i>  | 1300                | 300     | <i>IN7</i>  | ≥2100               | 300     | <i>ANT7</i>   | ≥1500               | 400     |  |
| <i>PN8</i>  | ≥2400               | 400     | <i>IN8</i>  | ≥2200               | 400     | <i>ANT8</i>   | ≥3100               | 700     |  |
| <i>PN9</i>  | ≥1200               | 500     | <i>IN9</i>  | ≥2100               | 500     | <i>ANT9</i>   | ≥2500               | 500     |  |
| <i>PN10</i> | -                   | 700     | <i>IN10</i> | 1600                | 400     |               |                     |         |  |
|             |                     |         | <i>IN11</i> | ≥1200               | 600     |               |                     |         |  |
|             |                     |         | <i>IN12</i> | ≥1600               | 400     |               |                     |         |  |
|             |                     |         | <i>IN13</i> | ≥2100               | 400     |               |                     |         |  |
|             |                     |         | <i>IN14</i> | 2100                | 400     |               |                     |         |  |
|             |                     |         | <i>IN15</i> | ≥2500               | 500     |               |                     |         |  |

\* Fontos megjegyezni, hogy az itt megadott értékek a rostrocaudalis kiterjedésre vonatkoznak és nem a rostrocaudalis hosszra. Utóbbit pontosan csak a nyúlványok összekötése után lehetne megmérni. Ugyancsak megemlítendő, hogy több sejt nyúlványrendszere láthatóan meghaladta a blokk egyik, vagy mindkét végét. Ezekben az esetekben a kiterjedés értéknél ezt „≥”-vel jelöltük.

## 8.2 PROJEKCIÓS NEURONOK

### 8.2.1 Contralateralisan megjelenő axonkollaterálisok

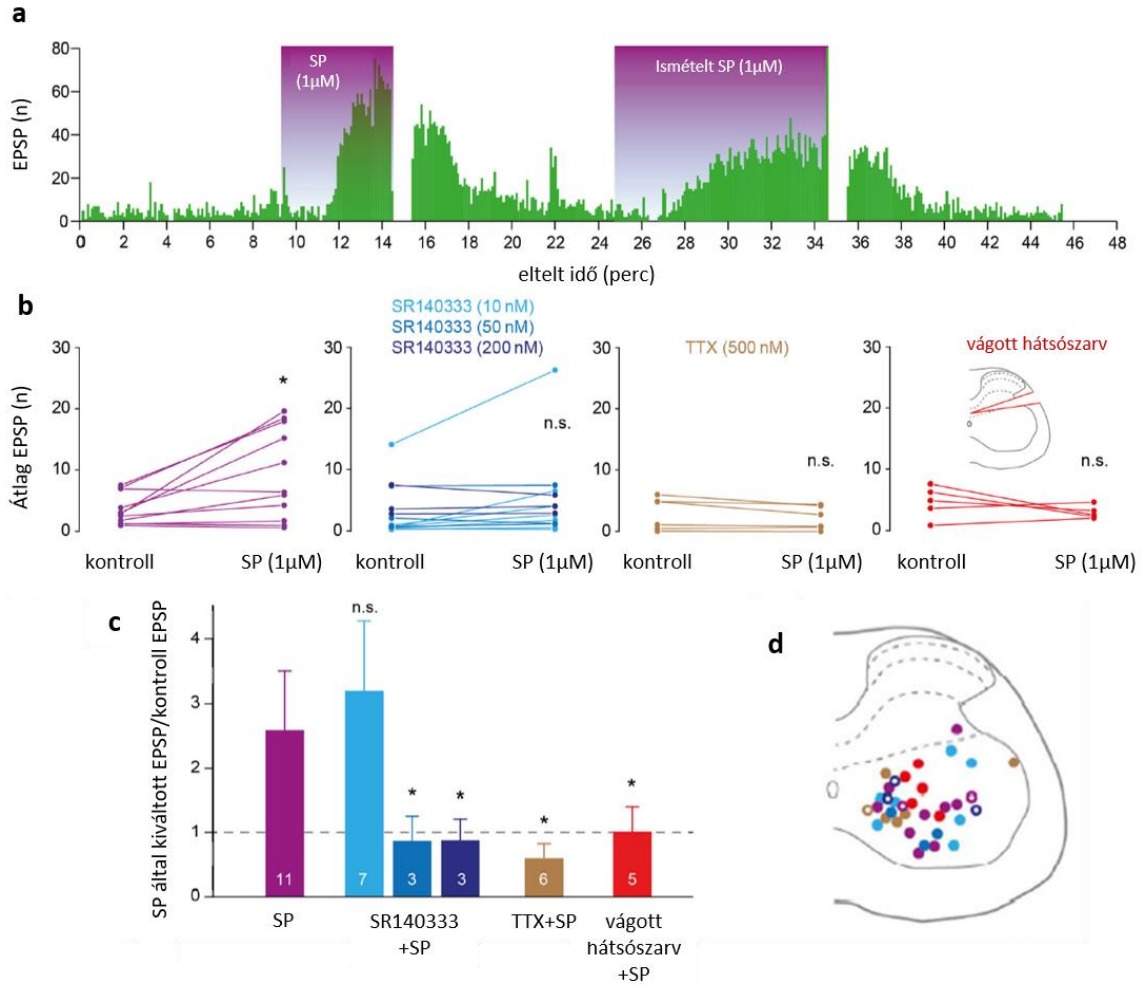
A PN-ok kollaterális-típusait vizsgáló korábbi munkákban a rekonstrukciókhoz használt metszetek a sagittalis síkban készültek így, a 3D rekonstrukció ellenére sem adtak részletes és teljes képet az interlamináris nyúlványeloszlásokról (Antal és mtsai. 2016; Szücs és mtsai. 2010), és valószínűleg ezért nem fedték fel azt a transversalis metszetek esetén egyébként jól követhető kollaterális típust, ami a commissura dorsalisban lépi át a középvonalat, vagy amelyik a contralateralis oldalon ágazik el a főaxonból. Munkám során transversalis metszetekből készült rekonstrukciókon a PN-ok 1/3-nál találtunk axont a contralateralis oldalon, illetve egy esetben egy IN axonág is átlépett a contralateralis oldalra. Ez a megfigyelés mindenképpen rámutat arra, hogy teljes 3D rekonstrukciók nélkül (lehetőleg több síkban készült metszetekből) a bonyolult lefutású axonok pontos eloszlása és finomszerkezete nehezen megismerhető.

Hasonló lefutású axonokat már korábban is leírtak a III-IV-es laminák lateralis felébe szúrt BDA (biotinilált dextransz amin) injekciókat követően, bár akkor ezek eredetként a felszínes hátsó szarv sejtjei nem merültek fel (Petkó és Antal 2000). Ugyanakkor a lateralisán elhelyezkedő PN-ok dendritjei, ahogy azt a dendrit részletes eloszlásvizsgálata feltárta, nagy számban küldenek a DLF dorsalis és oldalsó részébe is, ami igen közel esik a Petkó és Antal által adott BDA injekció helyéhez, így valószínű, hogy az I-es lamina PN-ok is felvehették a jelölőanyagot. Az általunk rekonstruált átkereszteződő kollaterálisokon megfigyelt varikozitások szinapszisokat adhatnak a X-es lamina sejtjein, amelyek között többféle vékony primer afferens rostból származó mono- és poliszinaptikus bemeneteket integráló, a nocicepcióban fontos szerepet játszó sejtek is vannak (Krotov és mtsai. 2019). Mivel az I-es lamina projekciós sejtjeinek ventralis kollaterálisai az V-ös laminában található további felszálló pályák eredő sejtjeiként funkcionáló neuronokat is innerválták (ipsilateralisan), ésszerű lehet azt feltételezni, hogy a PN-ok összehangolhatják, vagy legalábbis tájékoztathatják az egyéb modalitások feldolgozásáért felelős gerincvelői neuronokat, vagy akár az összes protopathias ingereket szállító felszálló rendszer sejtjeit.

### **8.2.2 A ventralis PN kollaterálisok aktiválhatják a mélyebb laminákban található hátsó szarvi neuronokat (Kiegészítő elektrofiziológiai kísérletek)**

A PN axonkollaterálisokról kapott, dorsoventralis információáramlást sejtető morfológiai eredményeinket jól alátámasztják témavezetőm korábbi elektrofiziológiai leletei (25. ábra). Ebben a kísérletsorozatban 6-15 napos Wistar patkány gerincvelői szeleteken történtek teljes-sejt patch-clamp mérések az V-VII laminák neuronjain (25. ábra, d), miközben a felszínes hátsó szarv neuronjait farmakológiailag P anyaggal (SP- *Substance P*) aktiválták (a kísérleti elrendezés részletes leírása: Szücs és mtsai. 2003; Kókai és mtsai. 2022).

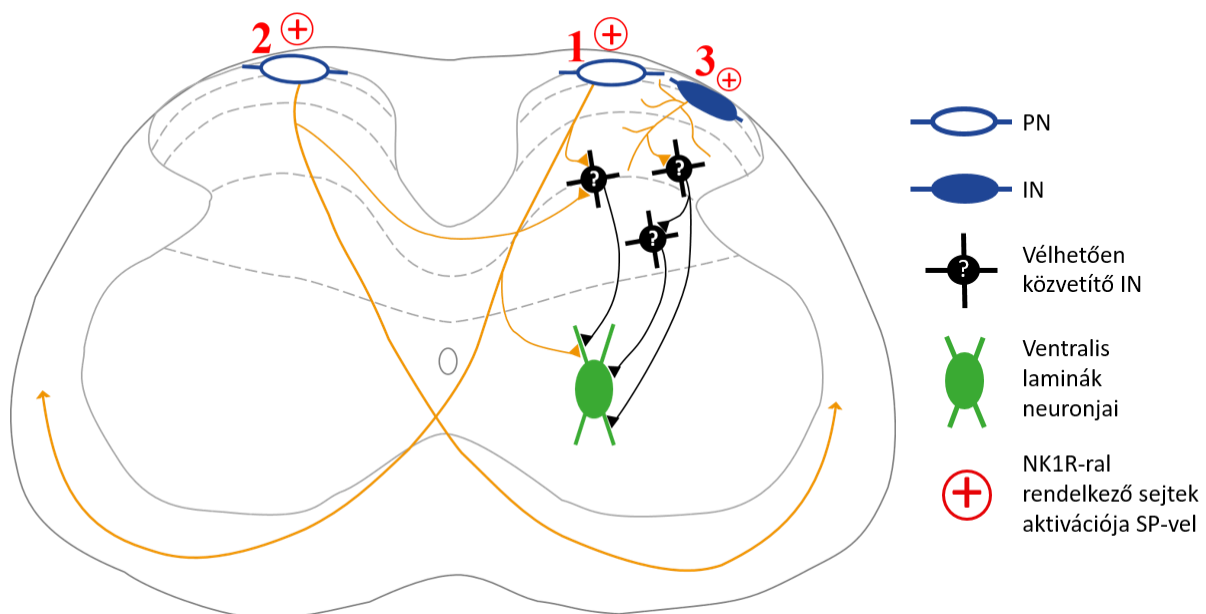
Neurokinin-1 receptort az I-es lamina neuronjainak közel 45%-a expresszál (Todd és mtsai. 1998), jelentősebb hányaduk valószínű serkentő sejt (Littlewood és mtsai. 1995). A PN-ok mintegy 80%-a fejezi ki a NK1R-t (Al-Khater és mtsai. 2008; Marshall és mtsai. 1996; Todd és mtsai. 2000), de az IN-ok is mutathatnak gyenge NK1R pozitivitást (Cheunsuang és Morris 2000; Al Ghamdi és mtsai. 2009), és egyharmaduk szintén reagál SP-re. Ez a hatás azonban kisebbnek bizonyult, mint a PN-oknál tapasztaltak (Luz és mtsai. 2014). A SP használatát követő depolarizáció időbeli lefolyása (Luz és mtsai. 2014, 7. ábra) arra utalhat, hogy funkcionálisan szignifikáns a különbség a PN és IN NK1R expressziója között. A NK1R-on keresztül kialakuló SP aktiváció a szeletben a serkentő poszt-szinaptikus potenciál (EPSP- *excitatory postsynaptic potential*) számának nagymértékű emelkedését váltotta ki VII-X-es laminákból elvezetett sejteken (25. ábra, a). Ez a hatás blokkolható volt mind szelektív NK1R antagonistával (SR140333), mind tetrodotoxinnal (TTX). Utóbbi kizárta a preszinaptikus NK1R aktivációnak lehetőségét (He és mtsai. 2019; Matsumura és mtsai. 2021). A ventralis információáramlás morfológiai hátterének alátámasztásaként pedig az ipsilaterális hátsó szarv tövénél végzett mechanikai szeparációja után a SP többé nem tudta kiváltani az EPSP-k számbeli növekedését (25. ábra, b).



25. ábra **Hátsó szarvi, NK1R-ral rendelkező neuronok ventralis irányú axonjaikkal hozzájárulnak a mélyebb laminákban lévő neuronok serkentéséhez.** a) Gerincvelői szeletpreparátumokban a SP alkalmazása (1 $\mu$ M) megemelte a spontán EPSP-k számát az V-VII-es laminákból elvezetett neuronokban. A SP ismételt alkalmazása hasonló, de mérsékeltebb EPSP szám emelkedést okozott. b) Az átlagos EPSP szám szignifikáns megemelkedése magasabb koncentrációjú NK1R antagonistá, SR140333 (50nM, 200nM) alkalmazásával megakadályozhatónak bizonyult. A TTX alkalmazása és a hátsó szarv mechanikai szeparálása szintén hatékonyan megakadályozta az EPSP szám emelkedést. c) A SP által kiváltott EPSP szám és a kontroll EPSP szám aránya a megfelelő koncentrációban használt SR140333 (50 nM, 200nM), TTX (500nM) és a mechanikai roncsolás esetén. Kontrollnak az átlag EPSP-szám arányát tekintettük kizárólag SP használatát követően ( $2.59 \pm 0.58$ ). d) Sematikus ábra az elvezetett neuronok elhelyezkedéséről. A tele körök jelölik a sikeresen előhívott sejteket, míg az üres körök helyzete az elektrofiziológiai mérés során készült jegyzőkönyv alapján került feltüntetésre a sejtek sikeres vizualizálásának hiányában. Statisztikai teszt: Kétmintás t-próba, Welch-korrektúrával; \* $p < 0,05$ . n.s.; nem szignifikáns

Megfigyelésünk, miszerint csak a magasabb koncentrációjú NK1R antagonistá volt képes blokkolni a SP által kiváltott ventralis irányú serkentést, azt jelezheti, hogy az I-es lamina interneuronjainak (gyengébb NK1R expresszióval) hozzájárulása valószínűleg kisebb, mint az NK1R-ban gazdagabb PN-oknak. Ennek ellenére hipotézisünk szerint mind a PN-ok, mind az IN-ok hozzájárulhatnak az anterolaterális felszálló rendszer összekapcsolásához más

felszálló útvonalakkal. Ezt erősíti az a megfigyelés, hogy a hátsó szarv mechanikai szeparációja megakadályozza a SP által kiváltott EPSP számbeli fokozódást a mély hátsó szarvi és ventralis laminákban. Morfológiai eredményeink azt sugallják az előzőekben bemutatott elektrofiziológiai eredmények tükrében, hogy az axonjukat főként a felszínes laminákra koncentráló IN-ok inkább indirekten befolyásolják a mélyebb laminák hálózatát más közbeiktatott interneuronokon keresztül (26. ábra, 3. útvonal). Ezzel szemben a PN-oknak jelentős mennyiségű kollaterális hálózata jelenik meg a mélyebb laminákban, amiken keresztül direkt módon is befolyásolhatják akár a motoros hálózatok interneuronjait, akár a motoneuronok dendritjeit, amelyeken akár közvetlenül monoszinaptikus kapcsolatot is képezhetnek (26. ábra).



26. ábra A PN ventralis axonkollaterálisok és az IN axonok feltételezett kapcsolatrendszere. (1) Ipsilateralis PN (üres kék sejt), (2) contralesionalis PN (üres kék sejt), commissura dorsalisban átlépő kollaterálissal, valamint (3) ipsilateralis oldalon elhelyezkedő IN (kitöltött kék sejt) helyi axonhálózata egyaránt hozzájárulhat a mély hátsó szarvi és ventralis laminák sejtjein (zöld sejt) kialakuló serkentésben, direkt vagy indirekt módon egy vagy több interneuronon keresztül (fekete sejt kérdőjellel). Az SP aktiváció mértékének feltételezett valószínűségét a piros karikában lévő „+” méretével jelöltük.

### 8.2.3 A PN-ok V-VII-es laminába küldött kollaterálisainak serkentő hatása közreműködhet a nociceptív flexor reflex kialakításában

A közelmúltban számos transzgenikus egértörzsekben hátsó szarvi interneuron típusokat célzó kísérletsorozat igazolta a mélyebb laminákból a felszínes laminák felé történő információáramlást, mind normál, mind pathológiás állapotokban (Braz és mtsai. 2014; Cordero-Erausquin és mtsai. 2016; Duan és mtsai. 2014; François és mtsai. 2017; Petitjean és

mtsai. 2015). A fájdalom transzmissziójának klasszikus (Melzack és Wall 1965), és újabb kapu-kontroll teóriái is a II-III-as lamina interneuronjait (Cordero-Erausquin és mtsai. 2016) anatómiai "kapunak" tekintik a különböző szenzoros modalitásokat szállító primer afferensek között. Az I-es lamina neuronjai, kiterjedt axonális kapcsolataik ellenére eddig ezekben a sematikus hálózatokban nem jelentek meg. Munkacsoportunk korábbi közleményeiben leírt hipotéziseket elsőként Browne és munkatársai (2021) támogatták közleményükben, ahol a PN-ok kollaterálisait, mint a gerincvelői fájdalominformáció feldolgozásában részt vevő, eddig mellőzött játékosként említik. A szerzők rámutatnak, hogy a kollaterálisok további lehetséges funkciói lehetnek a "feedforward" serkentés, valamint bizonyos gátló interneuronokon keresztül, indirekt módon megvalósuló gátlás is. A "feedforward" serkentést szomszédos PN-ok között egy direkt bizonyítékot szolgáltató közlemény (Luz és mtsai. 2010) igazolja, amelyben elektrofiziológiai mérés során találtak szinaptikusan összekapcsolt I-es lamina PN-okat. A fentiekben bemutatott gerincvelői szeleteken történt mérések (8.2.2. fejezet) további bizonyítékot szolgáltatnak az I-es lamina sejtek "feedforward" serkentésben való részvételére. A mély hátsó szarv és az intermediér szürkeállomány területén a kollaterálisok célpontjaiként felmerülnek az utolsó rendű premotoros interneuronok is, amelyeken keresztül a szenzoros aktiváció a motoneuronokat is eléri, potenciálisan hozzájárulva a nociceptív flexor reflex kialakulásához. A mély laminákban található WDR neuronok is képezhetik az I-es lamina PN-ok ventrális irányú kollaterálisainak célpontját, ilyen módon a nociceptív bemenetet szolgáltatva a supraspinalis központ felé továbbított integrált kimeneteikhez. Végül pedig, mind a tractus spinocerebellaris eredő neuronjai, mind az autonóm szimpatikus preganglionáris neuronok a thoracolumbaris szegmens laterális szarvában fogadhatnak szinaptikus bemeneteket a PN kollaterálisoktól.

### **8.3 INTERNEURONOK**

#### **8.3.1 Dendrit- és axonmegoszlási mintázat és funkcionális aszimmetria a gerincvelő hátsó szarvának felszínes lamináiban**

Az I-es lamina sejtei a hátsó szarvban a későn kifejlődő ("late-born") neuronpopulációba tartoznak. Míg a korábban születő dorsalis neuronok főként ventrolateralisan vándorolnak és találják meg a mélyebb laminákban végső elhelyezkedési területüket, addig a későn születő neuronok inkább dorsolateralisan vándorolnak és a felszínesebb laminákban helyezkednek el (Chen 2019). Ezek a postmitotikus sejtek migrációjuk során nyújtják ki neuritjeiket,

tangenciálisan az I-es lamina vékony sávjában, szoros kontaktusban maradva a TrkA+ (tropomyosin receptor kinase A) szenzoros afferensekkel (Roome és mtsai. 2022). Dendritjeik és axonjuk végső elrendezése térben korlátozott, hiszen a dorsalis felszín közelsége és a primer afferensek nagy sűrűsége a dorsalis gyökér belépési zónájában csak ventralis irányban teszi lehetővé a terjeszkedést. Ennek következtében az I-es lamina neuronjainak esetében jellemző egyfajta dorsoventralis aszimmetria és mind a PN-ok, mind az IN-ok rendelkezhetnek ventralis irányú dendritekkel (Kosugi és mtsai. 2013; Lima és Coimbra 1986; Szücs és mtsai. 2013). Ezeknek a ventralisan lenyúló dendriteknek a jelenléte vagy hiánya az I-es lamina sejteket két kategóriába sorolja, amelyek különböző módon végződő primer afferens rostokból kaphatnak bemenetet és különböző modalitásokat dolgozhatnak fel (Kosugi és mtsai. 2013).

Bár az I-es lamina neuronok nyúlványainak mediolateralis és rostrocaudalis növekedése kevésbé korlátozott, azonban eddig még fel nem tárt anatómiai akadályok ezekben az irányokban is létezhetnek. A dorsalis gyökér belépési zónájának medialisán belépő vastag primer afferensek sűrű kötegei például képezhetnek fizikai akadályt az I-es lamina neuronok növekedési folyamataiban. Erről az anatómiai és funkcionális mediolateralis irányú aszimmetriáról már korábban is beszámoltak az I-es lamina sejtek esetében (Kosugi és mtsai. 2013; Mizuno, Kato és Strassman 2019). Lézerszkennelő fotostimulációval bizonyos neuronok serkentő bemeneti zónái markáns medialis aszimmetriát mutattak, amelyek egyeztek a neuronok dendritikus mezőinek strukturális aszimmetriájával (Kosugi és mtsai. 2013). Ugyanennek a munkacsoportnak egy későbbi eredménye, hogy a hátsó szarv medialis és lateralis része a lokális elektromos stimulációra adott válaszaiban különbözik, ami belső felépítéséből, például a helyi kapcsolatok irányából ered. Hipotézisük az volt, hogy a felszínes hátsó szarv medialisabb neuronjai hajlamosak serkentő szinaptikus kapcsolatokat létesíteni a tőlük lateralisán elhelyezkedő neuronokkal és ez az irány megfordulhat lateralis irányba haladva (Mizuno és mtsai. 2019). Morfológiai eredményünk, miszerint a lateralisán elhelyezkedő IN-ok heterológ eloszlást mutatnak dendrit- és axondominancia tekintetében, kiválóan alátámasztja ezt a korábbi feltételezést.

Az I-es lamina egyes neuronjai rendelkeznek olyan varikozitást tartalmazó axonszakasszal, amik átfednek az ott található neuronok dendritfája által elfoglalt területtel (Bennett és mtsai. 1981). Jelen munkában azt találtuk, hogy az IN-ok nagy részében az axon a dendritfa körül foglalt helyet. Az IN-ok egy viszonylag elkülönülő csoportjánál ugyanakkor a medialisán is kiterjedt axon, lateralisán maradó dendritekkel társult. Ezt az axonkonfigurációt korábban már sagittalis metszetből történő rekonstrukció esetében is leírta

munkacsoportunk (Szücs és mtsai. 2013, 4. ábra), de alapos megértéséhez nagyon hasznos adalékot képeznek a transversalis metszetekből történt rekonstrukciók. Mélyebb laminákban korábban szintén igazoltak hasonló mediolateralis és lateromedialis projekciók jelenlétét (Petkó és Antal 2000), de a projekciók eredő sejtjeit nem sikerült azonosítani. Egy a közelmúltban a kisugárzó fájdalom szindrómát és bizonyos fejfájástípusokat vizsgáló tanulmányban, a vizsgálatot végző kutatók arra következtettek, hogy specifikus hátsó szarv neuronok képesek a lateralis és medialis primer afferens bemenetek belépési zónáit összekapcsolni, és mint egy anatómiai alapként szolgálnak a kisugárzó fájdalom és a lateromedialis információáramlás biztosításához (Defrin és mtsai. 2020). Erre a hipotézisre bizonyítékként szolgálhatnak a jelen munkában leírt mediálisan átívelő axonhálózattal rendelkező IN-ok, melyek lateromedialis irányú információáramlást biztosíthatnak. Ezt az elképzelést erősíti meg az is, hogy a legtöbb IN heterológ axon/dendrit eloszlást mutatott. Természetesen nem zárható ki, hogy ezek a polarizált neuronok, amelyek medialis axonnal és lateralis dendritfával rendelkeznek, szélsőséges példái lennének a lateromedialis információáramlásnak. Ugyanakkor ez felveti annak a lehetőségét, hogy a medialisan elhelyezkedő IN-ok axonjai hasonló módon elérhetik a hátsó szarv lateralis szélét, vagy akár a lateralis fehérállományt is. A kollaborációs partnerünk és munkacsoportunk által használt in vitro gerincvelői blokkpreparátum azonban kevésbé alkalmas medialisan elhelyezkedő neuronok elvezetésére és vizsgálatára, azért ennek a felvetésnek az igazolásához más kísérleti megközelítés lesz szükséges.

Az IN-ok esetében már számos neurokémiai markereken (Gatto és mtsai. 2019; Todd 2017) vagy genetikai háttéren (Häring és mtsai. 2018) alapuló osztályozás áll rendelkezésre az irodalomban. Kíváncos lenne az általunk feltárt morfológiai jegyeket ezekkel a beosztásokkal összevetni, azonban ezek a klasszifikációk döntő többsége egerekben végzett kísérletekből származik, ami a fajok közötti esetleges eltérések miatt akadályt képezhet. Másik akadálya az összevetésnek, hogy a mi morfometriai vizsgálatainkhoz a lehető legrészletgazdagabb, mindamellet stabil jelölésre volt szükségünk a hosszantartó rekonstrukciók elvégzése miatt. Rendelkezésünkre olyan előhívott sejtek álltak, amiket a klasszikus tormaperoxidáz-DAB reakcióval tettek láthatóvá, és ez megfelelt a fent ismertetett tulajdonságoknak.

Eseteinkben azonban nem találtunk korrelációt a vizsgált paramétereink és a szomatodendritikus típus, valamint tüzelési mintázat összevetésekor, ennek ellenére úgy

gondoljuk, hogy ezek a paraméterek (esetlegesen egy nagyobb esetszám vizsgálata esetén) segíthetnek az I-es lamina sejteinek pontosabb funkcionális csoportokba való besorolásában.

## **8.4 ANTENNA SEJTEK**

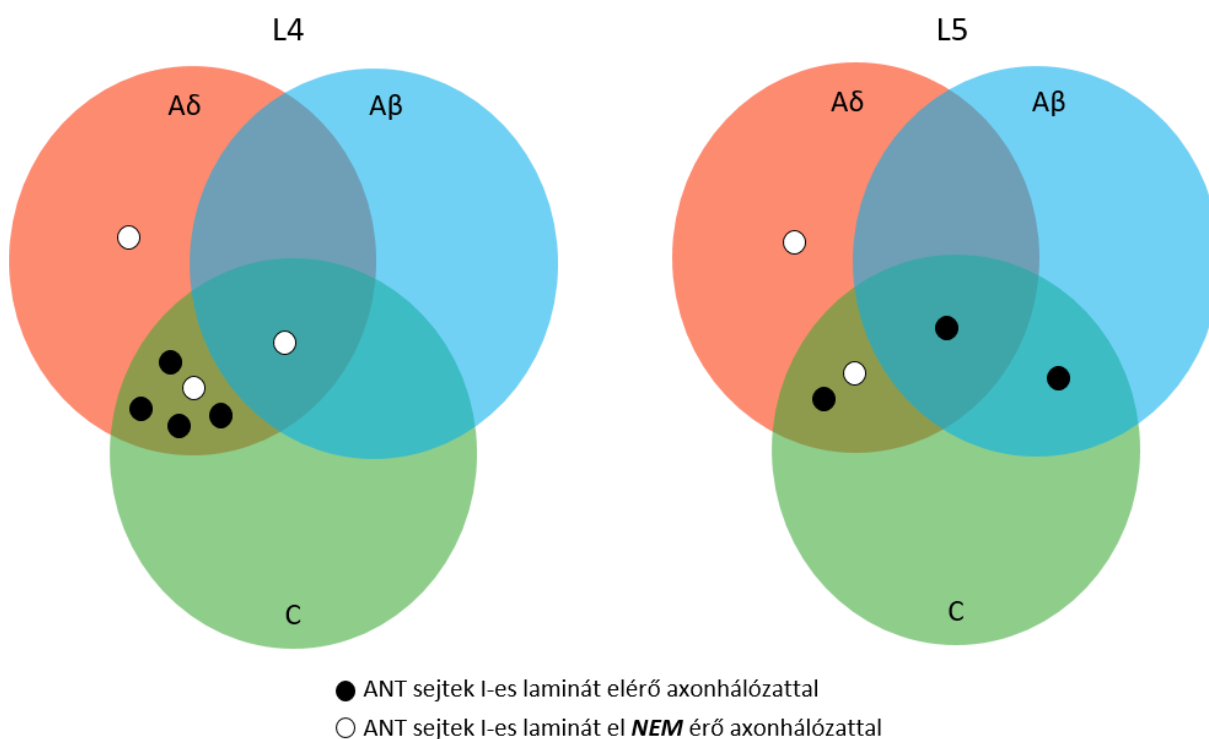
### **8.4.1 Morfológiából adódó sajátosságok**

Az ANT sejtek vizsgálata során végzett mérésorozatban a jelölt III-as lamina sejtek körülbelül 8%-a bizonyult antenna sejteknek, amelyek kivétel nélkül a kisebb méretűek közé tartoztak (Bleazard és mtsai. 1994; Littlewood és mtsai. 1995; Maxwell és mtsai. 2007; Réthelyi és Szentágothai 1973; Szentágothai 1964). Bár széleskörben elfogadott tény, hogy az antenna sejtek a projekciós neuronok közé tartoznak (Peirs és mtsai. 2020), az itt bemutatásra került neuronok egyike sem rendelkezett az ellenoldalra átlépő főaxonnal, annak ellenére, hogy a vizsgált sejteink szomatodendritikus jellege megegyezett az antenna sejtek leírásával. Az ANT sejteknek igen kiterjedt dorsoventralis irányú dendritfájuk van, ami széleskörű integratív funkcióra utal. Dorsalis dendritjeik számos szinapszist kapnak primer afferensektől, valamint spinalis interneuronoktól (Kókai, Alsulaiman és mtsai. 2022; Naim és mtsai. 1997, 1998; Polgár és mtsai. 1999; Todd 1989, 2002), míg a ventralis dendritek inkább a belső gerincvelői hálózat axonjaival, valamint mélyebb laminákban végződő primer afferensekkel létesítenek kapcsolatot. Egységes megjelenésük tehát valószínűsíti, hogy ugyanolyan szenzoros bemenetektől kapott információkat dolgoznak fel.

A III-V-ös laminában elhelyezkedő neuronok axonjairól ismert, hogy vagy a sejttestjük közelében ágaznak el, vagy egy ventralisan induló axonjuk ágazik el, majd fut rostralisán és caudalisán (Schneider 1992). Jelen munkában a vizsgált antenna sejteink axon eloszlásuk alapján 2 csoportra voltak oszthatóak. Egy esetben az axon főként a sejttest közelében és mélyebb laminákban foglalt helyet, valamint a funiculus dorsolateralis-ban, míg a másik csoport esetében az axonhálózat elérte az I-II-es laminát. Habár a felszínes laminákig eljutó axon mennyisége általában csekély volt, mégis magában hordozza a lehetőséget, hogy szinapszist képezzenek az I-es lamina sejtek ventralis dendritjein. Mivel a ventralis dendritekkel bíró ún. multipolaris szomatodendritikus morfológia elsősorban az I-es lamina IN-ok jellemzője (Fernandes és mtsai. 2016; Szücs és mtsai. 2013), ezért az ezt a morfológiát ritkábban mutató PN-ok valószínűleg kisebb eséllyel lesznek az ANT sejtek dorsalis axonjának célpontjai.

#### 8.4.2 Az antenna sejtek axoneloszlása nem mutat egyértelmű korrelációt primer afferens bemeneteikkel (*Kiegészítő elektrofiziológiai kísérletek*)

Hátsó gyökér stimuláció során kiderült, hogy a sejtek axoneloszlási mintázata nem mutat egyértelmű korrelációt azok primer afferens bemeneteinek típusával (27. ábra). A neuronok, melyek axonjának bizonyos százaléka (2-13,4%) megjelenik az I-es laminában, sok esetben kapnak A $\delta$  és C bemenetet, de ugyanez jellemző a sejttest körül koncentrálódó axonnal rendelkező ANT sejtekre is (üres körrel jelölve az ábrán). A mérés során a vezetési sebesség és az aktiválási küszöbérték figyelembevételével a primer afferens bemeneteket alacsony és magas küszöbűre osztották tovább kollaborációs partnereink.



27. ábra **ANT sejtek L4-es és L5-ös hátsó gyökér ingerlésével kiváltott monoszínaptikus primer afferens bemenetei.** Az ANT sejtek elsősorban A $\delta$  és C típusú primer afferensektől fogadtak monoszínaptikus bemenetet, melyek zöme a mérés szegmentumával megegyező L4-es szegmentumból származott, és csak kisebb mértékben a szomszédos L5-ösből. Az I-es laminát is elérő axonnal bíró ANT sejtek (fekete kör) saját szegmentális hátsó gyökereiktől kizárólag A $\delta$  és C bemenetet fogadtak, míg a szomszédos hátsó gyökértől két esetben A $\beta$  bemenet is érkezett rájuk.

Az A $\beta$  afferensek a III-VI-os laminákban végződnek és alacsony küszöbű mechanoreceptorként működnek (Brown 1981). Ebből adódóan feltételezhető lehetne, hogy az antenna sejtek proximalis vagy ventralis dendritjeit célozzák meg. Ennek ellenére, a vizsgált ANT sejtek ritkán fogadtak monoszínaptikus A $\beta$  bemenetet, ami egybe is vág azokkal

az immuncitokémiai adatokkal, amelyek viszonylag alacsony számú szinaptikus kapcsolatot mutattak a vastag myelinizált rostok és az NK1 pozitív antenna sejtek dendritjei között (Naim és mtsai. 1998). A megfigyelt A $\delta$  rost bemenetek ugyanakkor aktiválási küszöbértékeik alapján valószínűleg két primer afferens populációtól, az alacsony küszöbű A $\delta$  mechanoreceptoroktól és az A $\delta$  nociceptoroktól származott.

Az alacsony küszöbű A $\delta$  afferensek, beleértve a szőrtüsző afferenseket is, a III-as laminában végződnek (Light és Perl 1979), így ezek az A $\delta$  afferens rostok is elérhetik az antenna sejtek mélyebb laminákban található dendritjeit. Az A $\delta$  nociceptorok az I-es és V-ös laminában végződnek (Light és Perl 1979), felszínes tagjai az antenna sejtek dorsalis dendritjein képezhetnek szinapszisokat. Ezzel az adattal egybecseng az a tény, hogy kollaborációs partnereink elektrofiziológiai méréseiben az A $\delta$  nociceptorként azonosított ANT sejt bemenetek küszöbértéke egybeesett az I-es lamina PN-ok és IN-ok esetén mértekkel (Fernandes és mtsai. 2016; Luz és mtsai. 2014; Pinto és mtsai. 2010).

A vizsgált ANT sejtekben megfigyelhetőek voltak magas küszöbértékű A $\delta$  bemenetek, így feltételezhetjük, hogy az ANT sejtek a magas küszöbű A $\delta$  afferenseket az I-es laminába nyúló dorsalis, míg az alacsony küszöbű A $\delta$  bemenetet elsősorban a sejttest körüli, mélyebb laminákban előforduló dendritjeiken fogadják.

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a III-as lamina sejtek dorsalis dendritjei a II-es laminán áthaladó szakaszukon vékony nem-myelinizált C rostokkal alakítanak ki szinapszisokat (Naim és mtsai. 1997; Todd 1989, 2002). Elektrofiziológiai méréseink is igazolták, hogy az ANT sejtek erős bemenetet kapnak olyan primer afferensektől, amelyek C rostokra jellemző aktiválási küszöbvel és vezetési sebességgel bírtak. Ezek a bemenetek hatékonyan váltottak ki tüzelést, ami hasonló volt a mély hátsó szarvi neuronok (De Koninck és mtsai. 1992; Maxwell és mtsai. 2007; Schneider 1992) és néhány kisméretű I-es laminában található neuron (Fernandes és mtsai. 2016) nociceptív stimulusra adott válaszához. Az itt megfigyelt elnyújtott tüzelést nyilvánvalóan segítette a tónusos tüzelési mintázat, amik fontosak a hosszantartó szinaptikus kapcsolatok akciós potenciál-kisülések sorozatává történő átalakításához (Fernandes és mtsai. 2016; Schneider 2003).

Az ANT sejtek dorsalis és mélyebb dendritjeire esetlegesen szegregált módon érkező primer afferens bemenetek különösen érdekessé teszik azt a tényt, hogy nem mindegyik ANT-sejt axonja jut fel a felszínes laminákba. További részletes kutatásokat igényel majd annak a tisztázása, hogy a felszínes axonok bármilyen módon szelektálják- vagy modulálják-e az ANT

sejtek dorsalis dendritjeire érkező bemeneteket, és ilyen módon beleszólhatnak-e a mély dendritiken fogadott bemenettel való integrációba, ami végső soron az ANT sejtek kimenetét fogja meghatározni.

## 9 ÖSSZEFOGLALÁS

---

A dolgozatban bemutatott munka során összesen 34, a gerincvelő hátsó szarvából származó neuron teljes axon- és dendritálózatát rekonstruáltuk 3-dimenzióban. Legjobb tudásunk szerint ez az első ilyen részletességgel elvégzett morfometriai analízis ezeken a sejtípusokon. Az I-es és III-as lamina beli sejtek eltérő axonkollaterális megoszlása ezen neuroncsoportok eltérő szerepét feltételezi a gerincvelő szomatoszenzoros feldolgozó hálózatában.

Az eredményeinkben feltárt anatómiai aszimmetria az I-es lamina interneuronjai (IN) esetében magyarázatul szolgálhat bizonyos korábban leírt funkcionális aszimmetriákra, illetve egybecseng a kisugárzó fájdalmat lateromedialis információáramlással magyarázó irodalmi elképzelésekkel. A projekciós neuronok (PN) mélyebb laminákban található axonkollaterálisai hozzájárulhatnak egy, a mélyebb laminákat aktiváló dorsoventralis információáramláshoz. Ez az anatómiai kapcsolat eltérő felszállópályák funkcionális kapcsolatát teremtheti meg.

Az antenna (ANT) sejtek dendritfájának kiterjedése képessé teszi őket a különböző típusú primer afferens bemenetekből (A $\beta$ , A $\delta$  és C) származó modalitások integrálására, valamint WDR neuronként való működésre. Azok az ANT sejtek, melyek axonkollaterálisai a felszínes laminákba (I és II) is eljutnak, kapcsolódhatnak az I-es lamina PN-jaihoz és IN-jaihoz, valamint akár saját dorsalis dendritjeikre érkező szinaptikus bemeneteiket is modulálhatják. Ez az eredményeinkben feltárt útvonal a III-as lamina sejtjeinek anatómiai lehetőséget ad a nociceptív feldolgozókörökben való részvételre és lehetővé teszi, hogy alacsony küszöbű mechanoreceptorokból származó bemenetet közvetítsenek az I-es lamina sejtjei felé.

## 10 SUMMARY

---

In total, we analysed the full axonal and dendritic distribution of 34 spinal dorsal horn neurons from complete 3D neuronal reconstructions. To the best of our knowledge this is the first work that performed such detailed analyses. Our findings, based on the distinct local axon collateral distributions, suggest divergent roles of lamina I and III neurons in the dorsal horn somatosensory circuitry.

Our results showed anatomical asymmetry of lamina I interneurons (IN), that is in line with functional asymmetries and the explanation of radiating pain based on a theoretical mediolateral information flow, suggested by the literature. We suggest that ventral axon collaterals of projection neurons (PN) can directly mediate a dorsoventral excitatory drive to spinal neurons of deep layers upon sensory activation. These anatomical connections are likely to link different ascending systems of the spinal cord.

The dendritic features of the antenna (ANT) cells make them capable of integrating different types of modalities from A $\beta$ , A $\delta$  and C afferent inputs and to function as wide-dynamic range neurons. ANT cells with axon collaterals reaching lamina II and I probably connect them to lamina I PNs and INs and may even modulate synaptic input arriving to their own dorsal dendrites. The putative pathway based on our anatomical findings would enable lamina III neurons to participate in the nociceptive processing units and to relay low-threshold mechanoreceptor input to lamina I neurons.

## 11 IRODALOMJEGYZÉK

---

- Abraira, Victoria E. és David D. Ginty. 2013. „The Sensory Neurons of Touch”. *Neuron* 79(4):618–39. doi: 10.1016/j.neuron.2013.07.051.
- Al Ghamdi, K. S., E. Polgár és A. J. Todd. 2009. „Soma size distinguishes projection neurons from neurokinin 1 receptor-expressing interneurons in lamina I of the rat lumbar spinal dorsal horn”. *Neuroscience* 164(4):1794–1804. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.09.071.
- Al-Khater, Khulood M., Robert Kerr és Andrew J. Todd. 2008. „A quantitative study of spinothalamic neurons in laminae I, III, and IV in lumbar and cervical segments of the rat spinal cord”. *The Journal of Comparative Neurology* 511(1):1–18. doi: 10.1002/cne.21811.
- Antal, Zs, L. L. Luz, B. V Safronov, M. Antal és Peter Szücs. 2016. „Neurons in the lateral part of the lumbar spinal cord show distinct novel axon trajectories and are excited by short propriospinal ascending inputs.” *Brain structure & function* 221(4):2343–60. doi: 10.1007/s00429-015-1046-3.
- Beggs S, Torsney C, Drew LJ, Fitzgerald M. 2002. „The postnatal reorganization of primary afferent input and dorsal horn cell receptive fields in the rat spinal cord is an activity-dependent process”. *Eur J Neurosci.* 16(7):1249-58. doi: 10.1046/j.1460-9568.2002.02185.x.
- Del Barrio, Marta Garcia, Steeve Bourane, Katja Grossmann, Roland Schüle, Stefan Britsch, Dennis D. M. O’Leary és Martyn Goulding. 2013. „A Transcription Factor Code Defines Nine Sensory Interneuron Subtypes in the Mechanosensory Area of the Spinal Cord” szerkesztette M. L. Baccei. *PLoS ONE* 8(11):e77928. doi: 10.1371/journal.pone.0077928.
- Basbaum, Allan I., Diana M. Bautista, Grégory Scherrer és David Julius. 2009. „Cellular and Molecular Mechanisms of Pain”. *Cell* 139(2):267–84. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.028.
- Beal, J. A., J. E. Penny és H. R. Bicknell. 1981. „Structural diversity of marginal (lamina I) neurons in the adult monkey (*Macaca mulatta*) lumbosacral spinal cord: a golgi study.” *The Journal of comparative neurology* 202(2):237–54. doi: 10.1002/cne.902020209.

- Bennett, G. J., M. Abdelmoumene, H. Hayashi, M. J. Hoffert és R. Dubner. 1981. „Spinal cord layer I neurons with axon collaterals that generate local arbors”. *Brain Research* 209(2):421–26. doi: 10.1016/0006-8993(81)90164-5.
- Bleazard, L., R. G. Hill és R. Morris. 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.” *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 14(12):7655–64. doi: 10.1523/JNEUROSCI.14-12-07655.1994.
- Bourne, Sarah, Andre G. Machado és Sean J. Nagel. 2014. „Basic anatomy and physiology of pain pathways.” *Neurosurgery clinics of North America* 25(4):629–38. doi: 10.1016/j.nec.2014.06.001.
- Boyle, Kieran A., Maria Gutierrez-Mecinas, Erika Polgár, Nicole Mooney, Emily O’Connor, Takahiro Furuta, Masahiko Watanabe és Andrew J. Todd. 2017. „A quantitative study of neurochemically defined populations of inhibitory interneurons in the superficial dorsal horn of the mouse spinal cord.” *Neuroscience* 363:120–33. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.08.044.
- Braz, João, Carlos Solorzano, Xidao Wang és Allan I. Basbaum. 2014. „Transmitting Pain and Itch Messages: A Contemporary View of the Spinal Cord Circuits that Generate Gate Control”. *Neuron* 82(3):522–36. doi: 10.1016/j.neuron.2014.01.018.
- Brown, A. G. 1981. *Organization in the Spinal Cord*. London: Springer London. doi: 10.1007/978-1-4471-1305-8
- Brown, A. G. 1982. „The dorsal horn of the spinal cord.” *Quarterly journal of experimental physiology (Cambridge, England)* 67(2):193–212. doi: 10.1113/expphysiol.1982.sp002630.
- Brown, J. L., H. Liu, J. E. Maggio, S. R. Vigna, P. W. Mantyh és A. I. Basbaum. 1995. „Morphological characterization of substance P receptor-immunoreactive neurons in the rat spinal cord and trigeminal nucleus caudalis.” *The Journal of comparative neurology* 356(3):327–44. doi: 10.1002/cne.903560302.

- Browne, Tyler J., David I. Hughes, Christopher V. Dayas, Robert J. Callister és Brett A. Graham. 2020. „Projection Neuron Axon Collaterals in the Dorsal Horn: Placing a New Player in Spinal Cord Pain Processing”. *Frontiers in Physiology* 11. doi: 10.3389/fphys.2020.560802.
- Browne, Tyler J., Kelly M. Smith, Mark A. Gradwell, Jacqueline A. Iredale, Christopher V. Dayas, Robert J. Callister, David I. Hughes és Brett A. Graham. 2021. „Spinoparabrachial projection neurons form distinct classes in the mouse dorsal horn.” *Pain* 162(7):1977–94. doi: 10.1097/j.pain.0000000000002194.
- Cameron, Darren, Erika Polgár, Maria Gutierrez-Mecinas, Maria Gomez-Lima, Masahiko Watanabe és Andrew J. Todd. 2015. „The organisation of spinoparabrachial neurons in the mouse”. *Pain* 156(10):2061–71. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000270.
- Cavanaugh, Daniel J., Hyosang Lee, Liching Lo, Shannon D. Shields, Mark J. Zylka, Allan I. Basbaum és David J. Anderson. 2009. „Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(22):9075–80. doi: 10.1073/pnas.0901507106.
- Cervero, F. és A. Iggo. 1980. „THE SUBSTANTIA GELATINOSA OF THE SPINAL CORD”. *Brain* 103(4):717–72. doi: 10.1093/brain/103.4.717.
- Chen, Jun. 2011. „History of pain theories.” *Neuroscience bulletin* 27(5):343–50. doi: 10.1007/s12264-011-0139-0.
- Chen, Xiao-Jun és Yan-Gang Sun. 2020. „Central circuit mechanisms of itch”. *Nature Communications* 11(1):3052. doi: 10.1038/s41467-020-16859-5.
- Chen, Zhe. 2019. „Common cues wire the spinal cord: Axon guidance molecules in spinal neuron migration”. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 85:71–77. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.12.012.
- Cheunsuang, O. és R. Morris. 2000. „Spinal lamina I neurons that express neurokinin 1 receptors: morphological analysis.” *Neuroscience* 97(2):335–45. doi: 10.1016/s0306-4522(00)00035-x.

- Cordero-Erausquin, Matilde, Perrine Inquimbert, Rémy Schlichter és Sylvain Hugel. 2016. „Neuronal networks and nociceptive processing in the dorsal horn of the spinal cord”. *Neuroscience* 338:230–47. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.08.048.
- Crawford LK, Caterina MJ. 2020. „Functional Anatomy of the Sensory Nervous System: Updates From the Neuroscience Bench”. *Toxicologic Pathology*. 48(1):174-189. doi: 10.1177/0192623319869011
- Defrin, Ruth, Silviu Brill, Itay Goor-Arieh, Irene Wood és Marshall Devor. 2020. „“Shooting pain” in lumbar radiculopathy and trigeminal neuralgia, and ideas concerning its neural substrates”. *Pain* 161(2):308–18. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001729.
- Djoughri, Laiche és Sally N. Lawson. 2004. „A $\beta$ -fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals”. *Brain Research Reviews* 46(2):131–45. doi: 10.1016/j.brainresrev.2004.07.015.
- Duan, Bo, Longzhen Cheng, Steeve Bourane, Olivier Britz, Christopher Padilla, Lidia Garcia-Campmany, Michael Krashes, Wendy Knowlton, Tomoko Velasquez, Xiangyu Ren, Sarah Ross, Bradford B. Lowell, Yun Wang, Martyn Goulding és Qiufu Ma. 2014. „Identification of spinal circuits transmitting and gating mechanical pain.” *Cell* 159(6):1417–32. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.003.
- Fernandes, Elisabete C., Liliana L. Luz, Oleh Mytakhir, Nikolai V Lukoyanov, Peter Szucs és Boris V Safronov. 2016. „Diverse firing properties and A $\beta$ -, A $\delta$ -, and C-afferent inputs of small local circuit neurons in spinal lamina I.” *Pain* 157(2):475–87. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000394.
- Fernandes, Elisabete C., Ines C. Santos, Eva Kokai, Liliana L. Luz, Peter Szucs és Boris V. Safronov. 2018. „Low- and high-threshold primary afferent inputs to spinal lamina III antenna-type neurons”. *Pain* 159(11):2214–22. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001320.
- Fitzgerald, M. 1987. „Prenatal growth of fine-diameter primary afferents into the rat spinal cord: A transganglionic tracer study”. *J. Comp. Neurol.*, 261: 98-104. doi: <https://doi.org/10.1002/cne.902610108>
- Fitzgerald, M. 1987. „Spontaneous and evoked activity of fetal primary afferents in vivo”. *Nature*. 326, 603–605 doi: <https://doi.org/10.1038/326603a0>

- Fitzgerald, M. 1989. „The course and termination of primary afferent fibers”. O. 46–62 in *Textbook of pain*, szerkesztette P. D. Wall és R. Melczak. Edinburgh: Churchill Livingstone.
- Fonyó, A. 2014. *Az orvosi élettan könyve* . 7th kiad. Medicina.
- François, Amaury, Sarah A. Low, Elizabeth I. Sypek, Amelia J. Christensen, Chaudy Sotoudeh, Kevin T. Beier, Charu Ramakrishnan, Kimberly D. Ritola, Reza Sharif-Naeini, Karl Deisseroth, Scott L. Delp, Robert C. Malenka, Liqun Luo, Adam W. Hantman és Grégory Scherrer. 2017. „A Brainstem-Spinal Cord Inhibitory Circuit for Mechanical Pain Modulation by GABA and Enkephalins”. *Neuron* 93(4):822-839.e6. doi: 10.1016/j.neuron.2017.01.008.
- Fyffe, R. E. W. 1984. „Afferent fibers”. O. 79–136 in *Handbook of the spinal cord*, szerkesztette R. A. Davidoff. Marcel Dekker.
- Gatto, Graziana, Kelly Megan Smith, Sarah Elizabeth Ross és Martyn Goulding. 2019. „Neuronal diversity in the somatosensory system: bridging the gap between cell type and function”. *Current Opinion in Neurobiology* 56:167–74. doi: 10.1016/j.conb.2019.03.002.
- Gobel, S. 1978. „Golgi studies of the neurons in layer I of the dorsal horn of the medulla (trigeminal nucleus caudalis).” *The Journal of comparative neurology* 180(2):375–93. doi: 10.1002/cne.901800212.
- Gomba, Sz. 2005. *Hisztokémia Egészségügyi főiskolai jegyzetek* . 3rd kiad. Nyíregyháza.
- Gradwell, Mark A., Kieran A. Boyle, Tyler J. Browne, Andrew M. Bell, Jacklyn Leonardo, Fernanda S. Peralta Reyes, Allen C. Dickie, Kelly M. Smith, Robert J. Callister, Christopher V Dayas, David I. Hughes és Brett A. Graham. 2022. „Diversity of inhibitory and excitatory parvalbumin interneuron circuits in the dorsal horn.” *Pain* 163(3):e432–52. doi: 10.1097/j.pain.0000000000002422.
- Grudt, T. J. és E. R. Perl. 2002. „Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn.” *The Journal of physiology* 540(Pt 1):189–207. doi: 10.1113/jphysiol.2001.012890.

- Gutierrez-Mecinas, Maria, Andrew M. Bell, Alina Marin, Rebecca Taylor, Kieran A. Boyle, Takahiro Furuta, Masahiko Watanabe, Erika Polgár és Andrew J. Todd. 2017. „Preprotachykinin A is expressed by a distinct population of excitatory neurons in the mouse superficial spinal dorsal horn including cells that respond to noxious and pruritic stimuli”. *Pain* 158(3):440–56. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000778.
- Gutierrez-Mecinas, Maria, Andrew Bell, Erika Polgár, Masahiko Watanabe és Andrew J. Todd. 2019. „Expression of Neuropeptide FF Defines a Population of Excitatory Interneurons in the Superficial Dorsal Horn of the Mouse Spinal Cord that Respond to Noxious and Pruritic Stimuli”. *Neuroscience* 416:281–93. doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.08.013.
- Gutierrez-Mecinas, Maria, Takahiro Furuta, Masahiko Watanabe és Andrew J. Todd. 2016. „A quantitative study of neurochemically defined excitatory interneuron populations in laminae I–III of the mouse spinal cord”. *Molecular Pain* 12:174480691662906. doi: 10.1177/1744806916629065.
- Hamann, W. 2021. „History of Pain”. O. 3–10 in *Chronic Pain Management in General and Hospital Practice*. Singapore: Springer Singapore. doi: 10.1007/978-981-15-2933-7\_1
- Han, Liang, Chao Ma, Qin Liu, Hao-Jui Weng, Yiyuan Cui, Zongxiang Tang, Yushin Kim, Hong Nie, Lintao Qu, Kush N. Patel, Zhe Li, Benjamin McNeil, Shaoqiu He, Yun Guan, Bo Xiao, Robert H. LaMotte és Xinzhong Dong. 2013. „A subpopulation of nociceptors specifically linked to itch”. *Nature Neuroscience* 16(2):174–82. doi: 10.1038/nn.3289.
- Häring, Martin, Amit Zeisel, Hannah Hochgerner, Puneet Rinwa, Jon E. T. Jakobsson, Peter Lönnerberg, Gioele La Manno, Nilesch Sharma, Lotta Borgius, Ole Kiehn, Malin C. Lagerström, Sten Linnarsson és Patrik Ernfors. 2018. „Neuronal atlas of the dorsal horn defines its architecture and links sensory input to transcriptional cell types.” *Nature neuroscience* 21(6):869–80. doi: 10.1038/s41593-018-0141-1.
- He, Zi-Xuan, Ting-Yu Liu, Yue-Yue Yin, Hui-Fang Song és Xiao-Juan Zhu. 2019. „Substance P plays a critical role in synaptic transmission in striatal neurons”. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 511(2):369–73. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.02.055.
- Heise, Claire és Gulgun Kayalioglu. 2009. „Cytoarchitecture of the Spinal Cord”. O. 64–93 in *The Spinal Cord*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-374247-6.50010-9

- Huang, Jing, Erika Polgár, Hans Jürgen Solinski, Santosh K. Mishra, Pang-Yen Tseng, Noboru Iwagaki, Kieran A. Boyle, Allen C. Dickie, Mette C. Kriegbaum, Hendrik Wildner, Hanns Ulrich Zeilhofer, Masahiko Watanabe, John S. Riddell, Andrew J. Todd és Mark A. Hoon. 2018. „Circuit dissection of the role of somatostatin in itch and pain.” *Nature neuroscience* 21(5):707–16. doi: 10.1038/s41593-018-0119-z.
- Hylden, J. L., H. Hayashi, R. Dubner és G. J. Bennett. 1986. „Physiology and morphology of the lamina I spinomesencephalic projection.” *The Journal of comparative neurology* 247(4):505–15. doi: 10.1002/cne.902470410.
- Khan, Murad Ahmad, Fauzia Raza és Iqbal Akhtar Khan. 2015. „Pain: history, culture and philosophy.” *Acta medico-historica adriatica : AMHA* 13(1):113–30.
- Klausberger, Thomas és Peter Somogyi. 2008. „Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations.” *Science (New York, N.Y.)* 321(5885):53–57. doi: 10.1126/science.1149381.
- Kókai, Éva, Wafa Aa Alsulaiman, Allen C. Dickie, Andrew M. Bell, Luca Goffin, Masahiko Watanabe, Maria Gutierrez-Mecinas és Andrew J. Todd. 2022. „Characterisation of deep dorsal horn projection neurons in the spinal cord of the Phox2a::Cre mouse line.” *Molecular pain* 18:17448069221119614. doi: 10.1177/17448069221119614.
- Kókai, Éva, Lilana L. Luz, Elisabete C. Fernandes, Boris V Safronov, Pierrick Poisbeau és Peter Szucs. 2022. „Quantitative spatial analysis reveals that the local axons of lamina I projection neurons and interneurons exhibit distributions that predict distinct roles in spinal sensory processing.” *The Journal of comparative neurology* 530(18):3270–87. doi: 10.1002/cne.25413.
- De Koninck, Y., A. Ribeiro-da-Silva, J. L. Henry és A. C. Cuello. 1992. „Spinal neurons exhibiting a specific nociceptive response receive abundant substance P-containing synaptic contacts.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(11):5073–77. doi: 10.1073/pnas.89.11.5073.
- Kosugi, Masafumi, Go Kato, Stanislav Lukashov, Gautam Pendse, Zita Puskar, Mark Kozsurek és Andrew M. Strassman. 2013. „Subpopulation-specific patterns of intrinsic connectivity in mouse superficial dorsal horn as revealed by laser scanning photostimulation”. *The Journal of Physiology* 591(7):1935–49. doi: 10.1113/jphysiol.2012.244210.

- Krotov, Volodymyr, Anastasia Tokhtamysh, Boris V. Safronov, Pavel Belan és Nana Voitenko. 2019. „High-threshold primary afferent supply of spinal lamina X neurons”. *Pain* 160(9):1982–88. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001586.
- Larsson, Max. 2017. „Pax2 is persistently expressed by GABAergic neurons throughout the adult rat dorsal horn”. *Neuroscience Letters* 638:96–101. doi: 10.1016/j.neulet.2016.12.015.
- Latrémolière, Alban. 2016. „Spinal plasticity of the nociceptive system”. O. 35–87 in *An Introduction to Pain and its Relation to Nervous System Disorders*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. doi: 10.1002/9781118455968.ch2
- Lawson, S. N. 2002. „Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurones with C-, Delta- or Aalpha/beta-fibres.” *Experimental physiology* 87(2):239–44.
- Li, Jie és Mark L. Baccei. 2011. „Pacemaker neurons within newborn spinal pain circuits.” *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31(24):9010–22. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6555-10.2011.
- Light, A. R. és E. R. Perl. 1979. „Spinal termination of functionally identified primary afferent neurons with slowly conducting myelinated fibers.” *The Journal of comparative neurology* 186(2):133–50. doi: 10.1002/cne.901860203.
- Lima, D. 1998. „Anatomical basis for the dynamic processing of nociceptive input.” *European journal of pain (London, England)* 2(3):195–202. doi: 10.1016/s1090-3801(98)90015-5.
- Lima, Deolinda és Antonio Coimbra. 1986. „A Golgi study of the neuronal population of the marginal zone (lamina I) of the rat spinal cord”. *The Journal of Comparative Neurology* 244(1):53–71. doi: 10.1002/cne.902440105.
- Littlewood, N. K., A. J. Todd, R. C. Spike, C. Watt és S. A. S. Shehab. 1995. „The types of neuron in spinal dorsal horn which possess neurokinin-1 receptors”. *Neuroscience* 66(3):597–608. doi: 10.1016/0306-4522(95)00039-L.
- Lu, Yan, Hailong Dong, Yandong Gao, Yuanyuan Gong, Yingna Ren, Nan Gu, Shudi Zhou, Nan Xia, Yan-Yan Sun, Ru-Rong Ji és Lize Xiong. 2013. „A feed-forward spinal cord glycinergic neural circuit gates mechanical allodynia”. *Journal of Clinical Investigation* 123(9):4050–62. doi: 10.1172/JCI70026.

- Lu, Yan és Edward R. Perl. 2003. „A specific inhibitory pathway between substantia gelatinosa neurons receiving direct C-fiber input.” *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23(25):8752–58. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-25-08752.2003.
- Lu, Yan és Edward R. Perl. 2005. „Modular organization of excitatory circuits between neurons of the spinal superficial dorsal horn (laminae I and II).” *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25(15):3900–3907. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0102-05.2005.
- Luz, Liliana L., Peter Szucs, Raquel Pinho és Boris V. Safronov. 2010. „Monosynaptic excitatory inputs to spinal lamina I anterolateral-tract-projecting neurons from neighbouring lamina I neurons”. *The Journal of Physiology* 588(22):4489–4505. doi: 10.1113/jphysiol.2010.197012.
- Luz, Liliana L., Peter Szucs és Boris V. Safronov. 2014. „Peripherally driven low-threshold inhibitory inputs to lamina I local-circuit and projection neurones: a new circuit for gating pain responses”. *The Journal of Physiology* 592(7):1519–34. doi: 10.1113/jphysiol.2013.269472.
- Ma, W., A. Ribeiro-Da-Silva, Y. De Koninck, V. Radhakrishnan, J. L. Henry és A. C. Cuello. 1996. „Quantitative analysis of substance P-immunoreactive boutons on physiologically characterized dorsal horn neurons in the cat lumbar spinal cord.” *The Journal of comparative neurology* 376(1):45–64. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19961202)376:1<45::AID-CNE3>3.0.CO;2-O.
- Marshall, G. E., S. A. Shehab, R. C. Spike és A. J. Todd. 1996. „Neurokinin-1 receptors on lumbar spinothalamic neurons in the rat.” *Neuroscience* 72(1):255–63. doi: 10.1016/0306-4522(95)00558-7.
- Matsumura, Sachie, Kiyofumi Yamamoto, Yuka Nakaya, Kazunori O’Hashi, Keisuke Kaneko, Hiroki Takei, Hiromasa Tsuda, Tetsuo Shirakawa és Masayuki Kobayashi. 2021. „Presynaptic NK1 Receptor Activation by Substance P Suppresses EPSCs via Nitric Oxide Synthesis in the Rat Insular Cortex.” *Neuroscience* 455:151–64. doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.12.012.

- Maxwell, David J., Mino D. Belle, Ornsiri Cheunsuang, Anika Stewart és Richard Morris. 2007. „Morphology of inhibitory and excitatory interneurons in superficial laminae of the rat dorsal horn.” *The Journal of physiology* 584(Pt 2):521–33. doi: 10.1113/jphysiol.2007.140996.
- Melnick IV, Santos SF, Szokol K, Szûcs P, Safronov BV. 2004. Ionic basis of tonic firing in spinal substantia gelatinosa neurons of rat. *J Neurophysiol.* Feb;91(2):646–55. doi: 10.1152/jn.00883.2003.
- Melzack, Ronald és Patrick D. Wall. 1965. „Pain Mechanisms: A New Theory”. *Science* 150(3699):971–79. doi: 10.1126/science.150.3699.971.
- Merighi, Adalberto. 2018. „The histology, physiology, neurochemistry and circuitry of the substantia gelatinosa Rolandi (lamina II) in mammalian spinal cord.” *Progress in neurobiology* 169:91–134. doi: 10.1016/j.pneurobio.2018.06.012.
- Mesnage, Bruce, Stéphane Gaillard, Antoine G. Godin, Jean-Luc Rodeau, Matthieu Hammer, Jakob Von Engelhardt, Paul W. Wiseman, Yves De Koninck, Rémy Schlichter és Matilde Cordero-Erausquin. 2011. „Morphological and functional characterization of cholinergic interneurons in the dorsal horn of the mouse spinal cord.” *The Journal of comparative neurology* 519(16):3139–58. doi: 10.1002/cne.22668.
- Millan, M. J. 1999. „The induction of pain: an integrative review.” *Progress in neurobiology* 57(1):1–164. doi: 10.1016/s0301-0082(98)00048-3.
- Millan MJ. 2002. „Descending control of pain”. *Prog Neurobiol.* 66(6):355–474. doi: 10.1016/s0301-0082(02)00009-6.
- Mizuno, Masaharu, Go Kato és Andrew M. Strassman. 2019. „Spatial organization of activity evoked by focal stimulation within the rat spinal dorsal horn as visualized by voltage-sensitive dye imaging in the slice”. *Journal of Neurophysiology* 122(4):1697–1707. doi: 10.1152/jn.00697.2018.
- Molander, C., Q. Xu és G. Grant. 1984. „The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. I. The lower thoracic and lumbosacral cord.” *The Journal of comparative neurology* 230(1):133–41. doi: 10.1002/cne.902300112.

- Molander, C., Q. Xu, C. Rivero-Melian és G. Grant. 1989. „Cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat: II. The cervical and upper thoracic cord.” *The Journal of comparative neurology* 289(3):375–85. doi: 10.1002/cne.902890303.
- Naim, M. M., S. A. Shehab és A. J. Todd. 1998. „Cells in laminae III and IV of the rat spinal cord which possess the neurokinin-1 receptor receive monosynaptic input from myelinated primary afferents.” *The European journal of neuroscience* 10(9):3012–19. doi: 10.1111/j.1460-9568.1998.00335.x.
- Naim, M., R. C. Spike, C. Watt, S. A. Shehab és A. J. Todd. 1997. „Cells in laminae III and IV of the rat spinal cord that possess the neurokinin-1 receptor and have dorsally directed dendrites receive a major synaptic input from tachykinin-containing primary afferents.” *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 17(14):5536–48. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-14-05536.1997.
- Paxinos, G. és C. Watson. 2007. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6th kiad. Elsevier.
- Peirs, Cedric, Radhouane Dallel és Andrew J. Todd. 2020. „Recent advances in our understanding of the organization of dorsal horn neuron populations and their contribution to cutaneous mechanical allodynia.” *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* 127(4):505–25. doi: 10.1007/s00702-020-02159-1.
- Perl, Edward. 2013. „Nociceptor, Categorization”. O. 2238–42 in *Encyclopedia of Pain*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-28753-4\_2784
- Perl, Edward R. 2007. „Ideas about pain, a historical view.” *Nature reviews. Neuroscience* 8(1):71–80. doi: 10.1038/nrn2042.
- Petitjean, Hugues, Sophie Anne Pawlowski, Steven Li Fraine, Behrang Sharif, Doulia Hamad, Tarheen Fatima, Jim Berg, Claire M. Brown, Lily-Yeh Jan, Alfredo Ribeiro-da-Silva, Joao M. Braz, Allan I. Basbaum és Reza Sharif-Naeini. 2015. „Dorsal Horn Parvalbumin Neurons Are Gate-Keepers of Touch-Evoked Pain after Nerve Injury.” *Cell reports* 13(6):1246–57. doi: 10.1016/j.celrep.2015.09.080.
- Petkó, M. és M. Antal. 2000. „Propriospinal afferent and efferent connections of the lateral and medial areas of the dorsal horn (laminae I-IV) in the rat lumbar spinal cord”. *The Journal of Comparative Neurology* 422(2):312–25. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(20000626)422:2<312::AID-CNE11>3.0.CO;2-A.

- Pinto, Vítor, Peter Szucs, Deolinda Lima és Boris V Safronov. 2010. „Multisegmental A{delta}- and C-fiber input to neurons in lamina I and the lateral spinal nucleus.” *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30(6):2384–95. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3445-09.2010.
- Polgár, E., S. A. Shehab, C. Watt és A. J. Todd. 1999. „GABAergic neurons that contain neuropeptide Y selectively target cells with the neurokinin 1 receptor in laminae III and IV of the rat spinal cord.” *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19(7):2637–46. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-07-02637.1999.
- Polgár, Erika, Allen C. Dickie, Maria Gutierrez-Mecinas, Andrew M. Bell, Kieran A. Boyle, Raphaëlle Quillet, Elisha Ab Rashid, Ross A. Clark, Morgan T. German, Masahiko Watanabe, John S. Riddell és Andrew J. Todd. 2023. „Grpr expression defines a population of superficial dorsal horn vertical cells that have a role in both itch and pain”. *Pain* 164(1):149–70. doi: 10.1097/j.pain.0000000000002677.
- Polgár, Erika, Suzanne Thomson, David J. Maxwell, Khulood Al-Khater és Andrew J. Todd. 2007. „A population of large neurons in laminae III and IV of the rat spinal cord that have long dorsal dendrites and lack the neurokinin 1 receptor.” *The European journal of neuroscience* 26(6):1587–98. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05793.x.
- Prescott, Steven A. és Yves De Koninck. 2002. „Four cell types with distinctive membrane properties and morphologies in lamina I of the spinal dorsal horn of the adult rat.” *The Journal of physiology* 539(Pt 3):817–36. doi: 10.1113/jphysiol.2001.013437.
- Quillet, Raphaëlle, Allen C. Dickie, Erika Polgár, Maria Gutierrez-Mecinas, Andrew M. Bell, Luca Goffin, Masahiko Watanabe és Andrew J. Todd. 2023. „Characterisation of NPFF-expressing neurons in the superficial dorsal horn of the mouse spinal cord.” *Scientific reports* 13(1):5891. doi: 10.1038/s41598-023-32720-3.
- Rajneesh, Kiran és Robert Bolash. 2018. „Pathways of Pain Perception and Modulation”. O. 7–11 in *Fundamentals of Pain Medicine*. Cham: Springer International Publishing. doi: 10.1007/978-3-319-64922-1\_2
- Ramón y Cajal, S. 1909. *Histologie du Systeme Nerveux de l'homme et des Vertebres*. A. Maloine.

- Ranson, S. Walter. 1913. „The course within the spinal cord of the non-medullated fibers of the dorsal roots: A study of Lissauer’s tract in the cat”. *The Journal of Comparative Neurology* 23(4):259–81. doi: 10.1002/cne.900230401.
- Réthelyi, M. 1984. „Synaptic connectivity in the spinal dorsal horn”. O. 137–75 in *Handbook of the spinal cord*, szerkesztette R. A. Davidoff. Marcel Dekker.
- Réthelyi, M., A. R. Light és E. R. Perl. 1982. „Synaptic complexes formed by functionally defined primary afferent units with fine myelinated fibers.” *The Journal of comparative neurology* 207(4):381–93. doi: 10.1002/cne.902070409.
- Réthelyi, M. és J. Szentágothai. 1973. „Distribution and Connections of Afferent Fibres in the Spinal Cord”. in *Somatosensory System. Handbook of Sensory Physiology*. Köt. 2, szerkesztette A. Iggo. Springer.
- Rexed, B. 1952. „The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat.” *The Journal of comparative neurology* 96(3):414–95. doi: 10.1002/cne.900960303.
- Ribeiro-da-Silva, A. és Y. De Koninck. 2008. „Morphological and Neurochemical Organization of the Spinal Dorsal Horn”. O. 279–310 in *The Senses: A Comprehensive Reference*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-012370880-9.00163-8
- Ribeiro-Da-Silva, Alfredo. 2015. „Substantia Gelatinosa of the Spinal Cord”. O. 97–114 in *The Rat Nervous System*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-374245-2.00007-3
- Roome, R. Brian, Shima Rastegar-Pouyani, Amy Ker, Annie Dumouchel, Marie Kmita és Artur Kania. 2022. „Netrin1 and reelin signaling are required for the migration of anterolateral system neurons in the embryonic spinal cord”. *Pain* 163(4):e527–39. doi: 10.1097/j.pain.0000000000002444.
- Ross, M. H. 2007. *Szövettan kézikönyv és atlasz*. Medicina Könyvkiadó.
- Saliani, Ariane, Aldo Zaimi, Harris Nami, Tanguy Duval, Nikola Stikov és Julien Cohen-Adad. 2019. „Construction of a rat spinal cord atlas of axon morphometry.” *NeuroImage* 202:116156. doi: 10.1016/j.neuroimage.2019.116156.
- Santos, Sónia F. A., Sandra Rebelo, Victor A. Derkach és Boris V Safronov. 2007. „Excitatory interneurons dominate sensory processing in the spinal substantia gelatinosa of rat.” *The Journal of physiology* 581(Pt 1):241–54. doi: 10.1113/jphysiol.2006.126912.

- Schneider, S. P. 1992. „Functional properties and axon terminations of interneurons in laminae III-V of the mammalian spinal dorsal horn in vitro.” *Journal of neurophysiology* 68(5):1746–59. doi: 10.1152/jn.1992.68.5.1746.
- Schneider, S. P. 2003. „Spike frequency adaptation and signaling properties of identified neurons in rodent deep spinal dorsal horn.” *Journal of neurophysiology* 90(1):245–58. doi: 10.1152/jn.01012.2002.
- Schoenen, J. 1982. „The dendritic organization of the human spinal cord: the dorsal horn.” *Neuroscience* 7(9):2057–87. doi: 10.1016/0306-4522(82)90120-8.
- Schoenen, J. és R. L. M. Faull. 2004. „Spinal cord: Cyto- and Chemoarchitecture”. O. 190–232 in *The Human Nervous System*, szerkesztette G. Paxinos és J. K. Mai. San Diego: Elsevier.
- Seal, Rebecca P., Xidao Wang, Yun Guan, Srinivasa N. Raja, C. Jeffery Woodbury, Allan I. Basbaum és Robert H. Edwards. 2009. „Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors”. *Nature* 462(7273):651–55. doi: 10.1038/nature08505.
- Smith, Kelly M., Tyler J. Browne, Olivia C. Davis, A. Coyle, Kieran A. Boyle, Masahiko Watanabe, Sally A. Dickinson, Jacqueline A. Iredale, Mark A. Gradwell, Phillip Jobling, Robert J. Callister, Christopher V. Dayas, David I. Hughes és Brett A. Graham. 2019. „Calretinin positive neurons form an excitatory amplifier network in the spinal cord dorsal horn.” *eLife* 8. doi: 10.7554/eLife.49190.
- Smith, Kelly M. és Sarah E. Ross. 2020. „Making connections: recent advances in spinal cord dorsal horn circuitry.” *Pain* 161 Suppl 1:S122–26. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001980.
- Spike, R. C., Z. Puskar, D. Andrew és A. J. Todd. 2003. „A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord”. *European Journal of Neuroscience* 18(9):2433–48. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02981.x.
- Szentágothai, John. 1964. „Neuronal and synaptic arrangement in the substantia gelatinosa rolandi”. *Journal of Comparative Neurology* 122(2):219–39. doi: 10.1002/cne.901220207.

- Szücs, Peter, Liliana L. Luz, Deolinda Lima és Boris V. Safronov. 2010. „Local axon collaterals of lamina I projection neurons in the spinal cord of young rat”. *The Journal of Comparative Neurology* NA-NA. doi: 10.1002/cne.22391.
- Szücs, Péter, Liliana L. Luz, Raquel Pinho, Paulo Aguiar, Zsófia Antal, Sheena Y. X. Tiong, Andrew J. Todd és Boris V Safronov. 2013. „Axon diversity of lamina I local-circuit neurons in the lumbar spinal cord.” *The Journal of comparative neurology* 521(12):2719–41. doi: 10.1002/cne.23311.
- Szücs, Péter, Francis Odeh, Karolina Szokol és Miklós Antal. 2003. „Neurons with distinctive firing patterns, morphology and distribution in laminae V-VII of the neonatal rat lumbar spinal cord.” *The European journal of neuroscience* 17(3):537–44. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02484.x.
- Szücs, Péter, Vitor Pinto és Boris V. Safronov. 2009. „Advanced technique of infrared LED imaging of unstained cells and intracellular structures in isolated spinal cord, brainstem, ganglia and cerebellum”. *Journal of Neuroscience Methods* 177(2):369–80. doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.10.024.
- Todd, A. J. 1989. „Cells in laminae III and IV of rat spinal dorsal horn receive monosynaptic primary afferent input in lamina II.” *The Journal of comparative neurology* 289(4):676–86. doi: 10.1002/cne.902890411.
- Todd, A. J. 2002. „Anatomy of primary afferents and projection neurones in the rat spinal dorsal horn with particular emphasis on substance P and the neurokinin 1 receptor.” *Experimental physiology* 87(2):245–49. doi: 10.1113/eph8702351.
- Todd, A. J., M. M. McGill és S. A. Shehab. 2000. „Neurokinin 1 receptor expression by neurons in laminae I, III and IV of the rat spinal dorsal horn that project to the brainstem.” *The European journal of neuroscience* 12(2):689–700. doi: 10.1046/j.1460-9568.2000.00950.x.
- Todd, A. J., R. C. Spike és E. Polgár. 1998. „A quantitative study of neurons which express neurokinin-1 or somatostatin sst2a receptor in rat spinal dorsal horn”. *Neuroscience* 85(2):459–73. doi: 10.1016/S0306-4522(97)00669-6.

- Todd, A. J. és A. C. Sullivan. 1990. „Light microscope study of the coexistence of GABA-like and glycine-like immunoreactivities in the spinal cord of the rat.” *The Journal of comparative neurology* 296(3):496–505. doi: 10.1002/cne.902960312.
- Todd, Andrew J. 2006. „Chapter 6 Anatomy and neurochemistry of the dorsal horn”. O. 61–76 in *Handbook of Clinical Neurology*, Elsevier, Volume 81. doi: 10.1016/S0072-9752(06)80010-2
- Todd, Andrew J. 2010. „Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn”. *Nature Reviews Neuroscience* 11(12):823–36. doi: 10.1038/nrn2947.
- Todd, Andrew J. 2017. „Identifying functional populations among the interneurons in laminae I-III of the spinal dorsal horn”. *Molecular Pain* 13:174480691769300. doi: 10.1177/1744806917693003.
- Todd, Andrew J. és H. Richard Koerber. 2006. „Neuroanatomical substrates of spinal nociception”. O. 73–90 in *Wall and Melzack's Textbook of Pain*. Elsevier. doi: 10.1016/B0-443-07287-6/50009-6
- Todd, Andrew J. és Fan Wang. 2018. „Central Nervous System Pain Pathways”. O. 415–44 in *The Oxford Handbook of the Neurobiology of Pain*. Oxford University Press. doi: 10.1093/oxfordhb/9780190860509.013.5
- Varga, A., Z. Mészár, M. Sivadó, T. Bácskai, B. Végh, É. Kókai, I. Nagy és P. Szücs. 2021. „Spinal excitatory dynorphinergic interneurons contribute to burn injury-induced nociception mediated by phosphorylated histone 3 at serine 10 in rodents”. *International Journal of Molecular Sciences* 22(5). doi: 10.3390/ijms22052297.
- Wall PD, Lidierth M, Hillman P. 1999. „Brief and prolonged effects of Lissauer tract stimulation on dorsal horn cells”. *Pain*. 83(3):579-589. doi: 10.1016/S0304-3959(99)00170-0.
- Watson, Charles, George Paxinos, Gulgun Kayalioglu és Claire Heise. 2009. „Atlas of the Rat Spinal Cord”. O. 238–306 in *The Spinal Cord*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-374247-6.50019-5
- Willis, W. D. és R. E. Coggeshall. 1978. „Structure of the Dorsal Horn”. O. 53–127 in *Sensory Mechanisms of the Spinal Cord*. Boston, MA: Springer US. doi: 10.1007/978-1-4757-1688-7\_3

- Willis, William D. és Richard E. Coggeshall. 2004. „Sensory Pathways in the Dorsal Funiculus”. O. 597–664 in *Sensory Mechanisms of the Spinal Cord*. Boston, MA: Springer US. doi: 10.1007/978-1-4615-0035-3\_9
- Woolf, C. J. és A. E. King. 1989. „Subthreshold components of the cutaneous mechanoreceptive fields of dorsal horn neurons in the rat lumbar spinal cord.” *Journal of neurophysiology* 62(4):907–16. doi: 10.1152/jn.1989.62.4.907.
- Yasaka, Toshiharu, Sheena Y. X. Tiong, David I. Hughes, John S. Riddell és Andrew J. Todd. 2010. „Populations of inhibitory and excitatory interneurons in lamina II of the adult rat spinal dorsal horn revealed by a combined electrophysiological and anatomical approach”. *Pain* 151(2):475–88. doi: 10.1016/j.pain.2010.08.008.
- Yu, X. H., E. T. Zhang, A. D. Craig, R. Shigemoto, A. Ribeiro-da-Silva és Y. De Koninck. 1999. „NK-1 receptor immunoreactivity in distinct morphological types of lamina I neurons of the primate spinal cord.” *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19(9):3545–55. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-09-03545.1999.
- Zhang, E. T. és A. D. Craig. 1997. „Morphology and distribution of spinothalamic lamina I neurons in the monkey.” *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17(9):3274–84. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-09-03274.1997.
- Zhang, E. T., Z. S. Han és A. D. Craig. 1996. „Morphological classes of spinothalamic lamina I neurons in the cat.” *The Journal of comparative neurology* 367(4):537–49. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19960415)367:4<537::AID-CNE5>3.0.CO;2-5.
- Zylka, Mark J., Frank L. Rice és David J. Anderson. 2005. „Topographically Distinct Epidermal Nociceptive Circuits Revealed by Axonal Tracers Targeted to Mrgprd”. *Neuron* 45(1):17–25. doi: 10.1016/j.neuron.2004.12.015.



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/13/2024.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

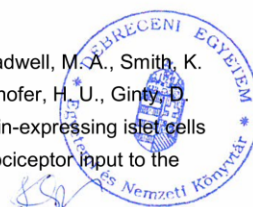
Jelölt: Kókai Éva  
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

## A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kókai, É.**, Luz, L. L., Fernandes, E. C., Safronov, B. V., Poisbeau, P., Szűcs, P.: Quantitative spatial analysis reveals that the local axons of lamina I projection neurons and interneurons exhibit distributions that predict distinct roles in spinal sensory processing.  
*J. Comp. Neurol.* 530 (18), 3270-3287, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cne.25413>  
IF: 2.5
2. Fernandes, E. C., Santos, I. C., **Kókai, É.**, Luz, L. L., Szűcs, P., Safronov, B. V.: Low- and high-threshold primary afferent inputs to spinal lamina III antenna-type neurons.  
*Pain.* 159 (11), 2214-2222, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001320>  
IF: 6.029

## További közlemények

3. Gutierrez-Mecinas, M., **Kókai, É.**, Polgár, E., Quillet, R., Titterton, H. F., Weir, G. A., Watanabe, M., Todd, A. J.: Antibodies Against the Gastrin-releasing Peptide Precursor Pro-Gastrin-releasing Peptide Reveal Its Expression in the Mouse Spinal Dorsal Horn.  
*Neuroscience.* 510, 60-71, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.12.023>  
IF: 3.3 (2022)
4. Davis, O. C., Dickie, A. C., Mustapa, M. B., Boyle, K. A., Browne, T. J., Gradwell, M. A., Smith, K. M., Polgár, E., Bell, A. M., **Kókai, É.**, Watanabe, M., Wildner, H., Zeilhofer, H. U., Ginty, D. D., Callister, R. J., Graham, B. A., Todd, A. J., Hughes, D. I.: Calretinin-expressing islet cells are a source of pre- and post-synaptic inhibition of non-peptidergic nociceptor input to the mouse spinal cord.  
*Sci. Rep.* 13 (1), 1-22, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-023-38605-9>  
IF: 4.6 (2022)





5. Luz, L. L., Lima, S., Fernandes, E. C., **Kókai, É.**, Gömöri, L., Szűcs, P., Safronov, B. V.:  
Contralateral Afferent Input to Lumbar Lamina I Neurons as a Neural Substrate for Mirror-  
Image Pain.  
*J. Neurosci.* 43 (18), 3245-3258, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1897-22.2023>  
IF: 5.3 (2022)
6. **Kókai, É.**, Alsulaiman, W. A. A., Dickie, A. C., Bell, A. M., Goffin, L., Watanabe, M., Gutierrez-  
Mecinas, M., Todd, A. J.: Characterisation of deep dorsal horn projection neurons in the  
spinal cord of the Phox2a::Cre mouse line.  
*Mol Pain.* 18, 1-16, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/17448069221119614>
7. Mészár, Z. M., **Kókai, É.**, Varga, R., Ducza, L., Papp, T., Béres, M., Nagy, M., Szűcs, P., Varga,  
A.: CRISPR/Cas9-Based Mutagenesis of Histone H3.1 in Spinal Dynorphinergic Neurons  
Attenuates Thermal Sensitivity in Mice.  
*Int. J. Mol. Sci.* 23 (6), 3178, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms23063178>  
IF: 5.6
8. Fernandes, E. C., Carlos, F. J., Luz, L. L., **Kókai, É.**, Mészár, Z. M., Szűcs, P., Safronov, B. V.:  
Processing of trigeminocervical nociceptive afferent input by neuronal circuitry in the upper  
cervical lamina I.  
*Pain.* 163 (2), 362-375, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002342>  
IF: 7.4
9. Papp, T., Ferenczi, Z., Szilágyi, B., Petró, M., Varga, A., **Kókai, É.**, Berényi, E., Oláh, G., Halmos,  
G., Szűcs, P., Mészár, Z. M.: Ultrasound Used for Diagnostic Imaging Facilitates Dendritic  
Branching of Developing Neurons in the Mouse Cortex.  
*Front. Neurosci.* 16, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2022.803356>  
IF: 4.3
10. Varga, A., Mészár, Z. M., Sivadó, M., Bácskai, T., Végh, B., **Kókai, É.**, Nagy, I., Szűcs, P.: Spinal  
Excitatory Dynorphinergic Interneurons Contribute to Burn Injury-Induced Nociception  
Mediated by Phosphorylated Histone 3 at Serine 10 in Rodents.  
*Int. J. Mol. Sci.* 22 (5), 1-28, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22052297>  
IF: 6.208
11. Fernandes, E. C., Pechincha, C., Luz, L. L., **Kókai, É.**, Szűcs, P., Safronov, B. V.: Primary  
afferent-driven presynaptic inhibition of C-fiber inputs to spinal lamina I neurons.  
*Prog. Neurobiol.* 188, 1-15, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101786>  
IF: 11.685





12. Luz, L. L., Fernandes, E. C., Sivadó, M., **Kókai, É.**, Szűcs, P., Safronov, B. V.: Monosynaptic convergence of somatic and visceral C-fiber afferents on projection and local circuit neurons in lamina I.  
*Pain.* 156 (10), 2042-2051, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000267>  
IF: 5.557

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 62,479**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
8,529**

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

Debrecen, 2024.01.16.



## 13 TÁRGYSZAVAK/ KEY WORDS

---

*fájdalom/ pain*

*gerincvelő/ spinal cord*

*felszínes laminák neuronjai/ neurons of the superficial laminae*

*3D sejtrekonstrukció/ 3D cell reconstruction*

*morfológiai karakterizálás/ morphological characterization*

*elektrofiziológia/ electrophysiology*

## 14 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

---

Első körben szeretném a portugál munkacsoport minden tagjának megköszönni a segítséget (i3S, Porto, Portugália), akikre nem is kollaborációs partnerként hivatkoznék, hanem közvetlen kollégákra, csak 3000 km-rel távolabbról segítettük egymás munkáját. Abban az igen kivételes helyzetben lehettem, hogy egy évet el is tölthettem velük Portóban, ami igazán fantasztikus és meghatározó élmény volt számomra. Külön ki kell emelnem Liliana Luz-t, akinek barátsága és útmutatása rengeteg erőt adott a megtett utam során. A PhD disszertációmhoz felhasznált publikációk is ebből a munkacsoportból indultak, köszönet Dr. Boris Safronovnak, a munkacsoport vezetőjének, valamint szerzőtársaimnak, hogy hozzájárultak tudásukkal a közlemények elkészültéhez és megengedték ezen eredmények felhasználását.

Köszönöm továbbá témavezetőmnek, Dr. Szücs Péternek, hogy egy olyan háttérrel biztosított munkámhoz, ami lehetőséget adott, hogy több nemzetközi laborban is kipróbáljam magam. Sosem fogom neki elfelejteni, hogy akkor bízott bennem, amikor én a legkevésbé hittem magamban.

Szeretném kifejezni hálám korábbi témavezetőimnek is, Dr. Pór Ágnesnek és Dr. Pál Balázsnak, akiktől rengeteget tanulhattam szakmailag és emberileg is, a tőlük megszerzett tapasztalatok végig kísérték PhD-s éveim alatt.

Köszönöm továbbá a családom támogatását, akik igyekeztek tartani bennem a lelket, amikor szükségem volt arra. Az elmúlt évek során meglévő barátságok mélyültek el, de újak is születtek. Köszönöm mindannyiuknak!

Mindemellett az elmúlt években nem csak ez a munka formálódott, hanem azzal együtt én is rengeteget változtam, amit nem érhettem volna el a munka környezetemben lévőkhöz nélkül. Nagyon szerencsésnek tartom magam, hogy rengeteg segítőkész emberrel találkozhattam utam során!

## 15 FÜGGELÉK

---

Az értekezést megalapozó közlemények különnyomatai.