

**AZ ENDOKANNABINOID RENDSZER MOLEKULÁRIS
SZERVEZŐDÉSE RÁGCSÁLÓK GERINCVELŐJÉNEK
FELÜLETES HÁTSÓ SZARVÁBAN**

Hegyi Zoltán

Témavezető: Dr. Antal Miklós



DEBRECENI EGYETEM

Idegtudományi Doktori Iskola

DEBRECEN, 2013.

AZ ENDOKANNABINOID RENDSZER MOLEKULÁRIS SZERVEZŐDÉSE RÁGCSÁLÓK GERINCVELŐJÉNEK FELÜLETES HÁTSÓ SZARVÁBAN

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

Írta: Hegyi Zoltán okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Idegtudományi Doktori Iskolája
keretében

Témavezető: Dr. Antal Miklós, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr. Csiba László, az MTA doktora
tagok: Dr. Jancsó Gábor, akadémikus
Dr. Fekete Csaba, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: 2013. szeptember 3.

Az értekezés bírálói:

Dr. Puskár Zita, PhD
Dr. Bíró Tamás, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. Csiba László, az MTA doktora
tagok: Dr. Jancsó Gábor, akadémikus
Dr. Fekete Csaba, az MTA doktora
Dr. Puskár Zita, PhD
Dr. Bíró Tamás, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: 2013. szeptember 3.

BEVEZETÉS

Pedanius Dioscorides, a görög orvos, farmakológus és botanikus i.e. 50 és 70 között írta meg *De Materia Medica* című ötkötetes könyvét, melyben több mint 500 gyógynövény felhasználását írta le különböző betegségek kezelésére. Ez a gyűjtemény több mint 19 évszázadon keresztül a felfedezésre váró hatóanyagok kimeríthetetlen forrása volt, és a mai napig számos gyógynövényt tartalmaz, melynek hatóanyaga vagy hatásmechanizmusa nem ismert.

A jeruzsálemi Hebrew University fiatal munkatársa, Raphael Mechoulam 1962-ben Dioscorides herbáriumából választott egy ígéretes növényt a kísérleteihez: a *Cannabis sativá*t, azaz a világszerte jól ismert és kábítószerként alkalmazott kenderet, melynek pszichoaktív hatóanyagát, a delta-9-tetrahidrokannabinolt (THC) két éven belül sikerült azonosítani. Rövidesen kiderült, hogy a THC alapvetően különbözik más növényi hatóanyagoktól, ugyanis hidrofób természete miatt apoláros oldószerekben és lipidekben oldódik. Emiatt feltételezték eleinte, hogy a THC nem specifikus receptorhoz kötődve, hanem a sejtmembrán biofizikai tulajdonságainak módosításán keresztül hat.

Több mint 20 évvel később, szelektív THC analógokkal végzett kísérletek derítettek fényt arra, hogy a THC főbb farmakológiai hatásai mind enantioszelektívek, és a cAMP felhalmozódás gátlásán keresztül valósulnak meg. Ezek a kísérletek azt sugallták, hogy léteznek kannabinoid-kötő receptorok, melyeket 1990-ben Matsuda és munkatársainak sikerült első ízben klónozni. A kannabinoid-1 receptor (CB1-R) felfedezése ugyan segített megmagyarázni a THC farmakológiai hatásait, ugyanakkor felvette egy endogén kannabinoid ligand létezésének kérdését is. A legnagyobb meglepetésre nem egy, hanem kettő kannabimimetikus vegyületet sikerült izolálni a '90-es évek elején: az anandamidot (arachidonoil-etanolamid) és a 2-arachidonoil-glicerolt (2-AG). Az elmúlt 20 évben az anandamid és a 2-AG bioszintetikus és katabolikus útvonalait katalizáló enzimeket, illetve további kannabinoid-szenzitív receptorokat is sikerült leírni. Az endogén kannabinoid ligandok, a szintézisükben és lebontásukban szerepet játszó enzimek, illetve a kannabinoid-szenzitív receptorokat együttesen endokannabinoid rendszernek nevezték el.

Habár a *Cannabis* évszázadokon keresztül főként élvezeti szerként, illetve kábítószerként volt ismert, orvosi előírás alapján fájdalom és görcsök enyhítésére is alkalmazták. Az orvosbiológiai kutatások azonban csak mostanában kezdtek érdemben

foglalkozni a Cannabisban rejlő terápiás lehetőségekkel, illetve az endokannabinoidok meglepően erőteljes élettani hatásaival, a rák és az epilepszia befolyásolásától a fertilitásban és az elhízásban játszott szerepéig. Az egyik legérdekesebb, mesterséges és endogén kannabinoid ligandokkal kapcsolatos megfigyelés, hogy mindannyian olyan erősen csillapítják a fájdalmat, hogy hatásosságuk és hatékonyságuk a morfinéval vetekszik. Ismeretes, hogy az endokannabinoid rendszer molekuláris komponensei, elsődlegesen a CB1-R megtalálható számos, a fájdalom közvetítésében és feldolgozásában szerepet játszó idegrendszeri területen, perifériás, gerincvelői és szupraspinalis szinten egyaránt.

Wall és Melzack fájdalomfeldolgozásra vonatkozó kapu-kontroll elmélete alapján a gerincvelő hátsó szarvában található neuronhálózatok jelentik a központi idegrendszer elsődleges fájdalomfeldolgozó területét. Immunhisztokémiai és in situ hibridizációs kísérletek alapján a CB1-R erőteljesen expresszálódik a gerincvelő felületes hátsó szarvában. Az erre vonatkozó molekuláris anatómiai adatok nagyban hozzájárultak az intratekálisan alkalmazott kannabinoid ligandok antinociceptív hatásának megértéséhez. Azonban a CB1-R lamináris és celluláris megoszlása a gerincvelő I-II. lamináiban, melyek a fájdalomfeldolgozó neuronhálózatot tartalmazzák, továbbra is ellentmondásos.

A gerincvelői endokannabinoid rendszer működésének megértését tovább nehezíti, hogy meglepően kevés adat áll rendelkezésre az endokannabinoid mobilizáció molekuláris anatómiai háttéréről a gerincvelő szintjén. Habár a 2-AG szintetizáló enzimének, a diacilglicerol-lipáz alfának (DGL- α) az ultrastrukturális lokalizációját meggyőző kísérletes eredmények alapján ismerjük, semmit sem tudni a DGL- α megoszlásáról a gerincvelő sejtes elemei között.

Az anandamid bioszintézisének morfológiai vizsgálata okozza talán a legtöbb nehézséget, ugyanis legalább öt, egymástól részben független biokémiai útvonal érintett az anandamid mobilizációjában. Ezek közül talán a legfontosabbnak az utolsó lépését az N-acilfoszfátidil-etanolamin-specifikus foszfolipáz D (NAPE-PLD) katalizálja. Korábbi tanulmányok alapján a NAPE-PLD axonális kalciumraktárak intracelluláris membránciszternáihoz kapcsolatosan expresszálódik, azonban a NAPE-PLD szomatodendritikus lokalizációját bemutató tanulmányok is ismertek. A NAPE-PLD gerincvelői expressziójáról kísérleteink kezdetekor semmilyen irodalmi adat nem állt rendelkezésre.

CÉLKITŰZÉSEK

Habár irodalmi adatok alapján a kannabinoid-mediált szabályozó mechanizmusok kiemelt szerepet játszanak a gerincvelői fájdalomfeldolgozás modulálásában, a gerincvelő felületes hátsó szarvi endokannabinoid szignalizációs apparátus molekuláris architektúráját sokkal kevésbé tanulmányozták eddig, mint pl. az agykéreg vagy a hippocampusformáció kannabinoid rendszerét. Kísérleteink célja az endokannabinoid rendszer molekuláris szerveződésének részletes molekuláris anatómiai leírása volt rágcsálók gerincvelőjének felületes hátsó szarvában.

Vizsgálatainkban célul tűztük ki

- a CB1-R megoszlásának leírását celluláris és szubcelluláris szinten egyaránt a gerincvelő felületes hátsó szarvában
- a DGL- α és NAPE-PLD sejtszintű és ultrastrukturális lokalizációjának részletes leírását a gerincvelő I-II. lamináiban
- a CB1-R, DGL- α és NAPE-PLD expressziójának vizsgálatát a gerincvelő felületes hátsó szarvába található gliasejteken.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleti állatok és a szövetszettek előkészítése

Kísérleteinket 17 felnőtt (250-300g) patkányon, 4 vad típusú egéren, 2 CB1 génkiütött és 1 NAPE-PLD génkiütött egéren végeztük. A kísérleti állatok közül 14-et mély altatásban (50 mg / ttkg Na-pentobarbitál, intraperitoneálisan) transzkardiálisan perfundáltunk először Tyrode oldattal (melyet 95% O₂ és 5% CO₂ keverékével oxigenizáltunk), majd a következő fixálószerrel egyikével:

- (1) 4% paraformaldehid (3 patkány és az összes egér, peroxidáz alapú és kettős fluoreszcens immunfestésekhez),
- (2) 4% paraformaldehid és 0.1% glutáraldehid (3 patkány, elektronmikroszkópra szánt preembedding immunfestéshez DGL- α és NAPE-PLD esetében), vagy
- (3) 2.5% paraformaldehid és 0.5% glutáraldehid (peroxidáz és nanogold alapú immunhisztokémiai vizsgálatokhoz CB1-R esetében).

A fixálószerrel 0.1 M foszfát pufferben (PB) oldottuk fel.

További 3 patkány esetén a transzkardiális perfúziót megelőzően 2 héttel dorzális rizotómiát végeztünk, azaz sorozat-laminektómiát követően feltártuk a lumbalis gerincvelőt, és az L2-S1 gerincvelői idegek hátsó gyökerét az egyik oldalon átvágtuk.

A transzkardiális perfúziót követően a gerincvelők L3-L5 szegmentumait eltávolítottuk, utófixáltuk a megfelelő fixálószerrel 4 órán keresztül, majd először 0.1 M PB-ben oldott 10%-os, azután 20%-os szacharóz oldatba helyeztük őket, amíg lesüllyedtek. Az antitestek és reagensek penetrációjának elősegítésére a gerincvelőket folyékony nitrogénben pillanatszerűen lefagyasztottuk, majd szobahőmérsékletű PB-rel felolvasztottuk. Vibrotom segítségével 50 μ m vastag metszeteket készítettünk, melyeket alaposan átmostuk 0.1 M PB-rel.

Immunhisztokémia

Egyszeres immunfestéseket végeztünk a CB1-R, DGL- α és NAPE-PLD lamináris megoszlásának vizsgálatára. Az úszó metszeteket 10%-os kecske szérumban 50 percig tartó blokkolás után először (1) nyúlban termeltetett CB1-R elleni antitesttel (1:5,000), (2) nyúlban termeltetett DGL- α elleni antitesttel (1:1,000) vagy (3) tengerimalacban termeltetett NAPE-PLD elleni antitesttel (1:200) inkubáltuk 48 órán keresztül 4 °C-on. Ezután alapos mosást követően a metszeteket biotinilált, kecskében termeltetett nyúl elleni IgG-vel vagy kecskében termeltetett tengerimalac elleni IgG-vel (1:200) kezeltük 12 órán át 4 °C-on. Ezt követően a metszeteket avidin biotinilált tormaperoxidázkomplex-szel (1:100) inkubáltuk 5 órán át szobahőn, végül a reakciót 3,3'-diaminobenzidin (DAB) kromogén reakcióval tettük láthatóvá. A metszeteket zselatinózott tárgylemezre szedtük fel, majd felszálló alkoholsorban víztelenítettük, és Permout fedőanyaggal fedtük le.

A CB1-R, DGL- α és NAPE-PLD immunreaktivitás, illetve a nociceptív primer afferensek, glutamaterg és GABAerg gerincvelői interneuron axonterminálisok, továbbá asztrociták és mikroglia sejtek kolokalizációjának vizsgálatára kettős immunfestéseket végeztünk. Úszó metszeteket először primer antitestek keverékével inkubáltuk 2 éjszakán át 4 °C-on, amely a nyúl anti-CB1-R (1:5,000), nyúl anti- DGL- α (1:1,000) vagy tengerimalac anti-NAPE-PLD antitest (1:200) mellett a következő antitestek egyikét tartalmazta: (1) tengerimalac anti-kalcitonin gén-relációs peptid (CGRP; 1:2,000), (2) nyúl anti-kalcitonin gén-relációs peptid (CGRP; 1:10,000), (3) biotinilált izolektin B4 (IB4; 1:2,000), (4) tengerimalac anti-vezikuláris glutamát transzporter-2 (VGLUT2; 1:2,000), (5) egér anti-vezikuláris glutamát transzporter-2 (1:10,000), (6) egér anti-glutaminsav dekarboxiláz 65 és 67 keveréke (GAD65 és GAD67; 1:1,000), (7) egér anti-gliális fibrilláris savas protein (GFAP; 1:1,000) és (8) egér anti-CD11b (1:500).

A metszeteket ezt követően szekunder antitestek megfelelő keverékével 2 órán át kezeltük, melyeket a következők közül választottunk ki: (1) kecske anti-nyúl IgG Alexa Fluor 555-tel konjugálva (1:1,000), (2) kecske anti-tengerimalac IgG Alexa Fluor 488-cal konjugálva (1:1,000), (3) kecske anti-egér IgG Alexa Fluor 488-cal kombinálva (1:1,000), (4) kecske anti-tengerimalac IgG Alexa Fluor 555-tel konjugálva (1:1,000), (5) kecske anti-nyúl IgG Alexa Fluor 488-cal konjugálva (1:1,000) és (6) streptavidin Alexa Fluor 488-cal konjugálva (1:1,000).

Többszöri mosást követően a metszeteket tárgylemezre szedtük fel és Vectashield fedőanyaggal fedtük le.

Konfokális mikroszkópia és képelemzés

Olympus FV1000 konfokális mikroszkóp segítségével 1 μm vastagságú optikai szeletek sorozatáról készítettünk felvételeket a z tengely mentén 0.3 μm -es eltolással. A felvételek készítéséhez 60-szoros nagyítású olajimmerziós objektívet (NA:1.4) használtunk. A fényképezés során a konfokális mikroszkóp beállításai minden metszet esetében azonosak voltak, és kiemelt figyelmet fordítottunk arra, hogy a markereinket jelző pixelek ne legyenek telítettek. Az elkészült felvételeket Adobe Photoshop CS5 szoftver segítségével elemeztük.

A kettősen immunfestett metszetek alapján elvégeztük a CB1-R, DGL- α és NAPE-PLD, illetve a vizsgált markerek kolokalizációjának kvantitatív elemzését. Ehhez a felvételeknek a gerincvelő I-II. lamináit reprezentáló területeire 10x10-es optikai rácsot helyeztünk, melynek mérete 40 μm x 40 μm volt. A kolokalizációs vizsgálatokhoz az optikai rácsot gerincvelő legfelületesebb 150 μm szélességű területére illesztettük, amely kellő pontossággal határozza meg a gerincvelő I-II. lamináit az L3-L5 szegmentumok magasságában. A kvantitatív elemzésnél azokat a CB1-R, DGL- α és NAPE-PLD immunreaktív foltokat vettük figyelembe, amelyek érintették a korábban meghatározott grid rácsvonalait az I-II. laminák mediális és laterális részeiben. Az így kiválasztott profilokat ezt követően egyesével megvizsgáltuk, hogy mutatnak-e immunreaktivitást az alkalmazott axonális vagy gliális markerre is. Mivel a kísérleteinkhez felhasznált CB1-R, DGL- α és NAPE-PLD antitestek a fehérjék intracelluláris doménjeit ismerik fel, ezért kolokalizáció meghatározásánál csak azokat a CB1-R, DGL- α és NAPE-PLD immunreaktív foltokat tekintettük kolokalizálónak, amelyek teljes mértékben a vizsgált marker határain belül helyezkedtek el. A kolokalizációt minden marker esetén három állatból származó mintákon elemeztük. A kvantitatív elemzést minden állatból véletlenszerűen kiválasztott 3-3 metszeten végeztük el. Így a kvantitatív adatokat, átlagokat és mérések standard hibáit (standard error of mean, SEM) minden marker esetén 9 metszet alapján határoztuk meg.

Preembedding immunfestés DAB kromogén reakcióval elektronmikroszkópos vizsgálatokra

A preembedding immunfestést az egyszeres immunhisztokémiai protokollhoz hasonlóan végeztük a DGL- α és NAPE-PLD celluláris megoszlásának ultrastrukturális vizsgálatára. A metszeteket 0.1 M PB-rel alaposan átmostuk, majd 1% nátrium-borohidrid oldattal kezeltük 30 percig. Ezt követően a metszeteket először nyúl anti-DGL- α (1:1,000) vagy tengerimalac anti-NAPE-PLD antitesttel (1:200) 48 órán át 4 °C-on, majd biotinilált kecske anti-nyúl IgG-vel vagy kecske anti-tengerimalac IgG-vel (1:200) 12 órán át 4 °C-on inkubáltuk. Végül a metszeteket avidin biotinilált tormaperoxidáz komplex-szel (1:100) inkubáltuk 5 órán át szobahőmérsékleten. Az immunreakciót 3,3'-diaminobenzidin kromogén reakcióval tettük láthatóvá.

Az immunfestett metszeteket 0.5% ozmium-tetroxiddal kezeltük 45 percig, majd felszálló alkoholsorban és propilén-oxidban víztelenítettük, Durcupan ACM műgyantába ágyaztuk, végül tárgylemezre helyeztük és a műgyantával lefedtük. A legszebb jelölést mutató metszetekből kivágtuk a hátsó szarvat, amelyet műanyag kapszulában újra beágyaztunk Durcupan ACM műgyantába. A műgyanta polimerizációja után az újraágyazott metszetekből ultravékony (60 nm) sorozatmetszeteket készítettünk, amelyeket Formvar-hártyával fedett, nikkel „slot” grid-ekre szedtünk fel és uranil-acetáttal, illetve ólom-nitráttal kontrasztoltunk meg.

Preembedding nanogold immunhisztokémiai vizsgálatok

A CB1-R, DGL- α and NAPE-PLD ultrastrukturális megoszlásának vizsgálatára preembedding nanogold immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk. A lumbális gerincvelőkből származó 50 μ m-es úszó metszeteket először 0,1 M-os foszfát pufferrel (PB) átmostuk, majd 1%-os nátrium-borohidrid oldattal kezeltük 30 percig. Ezután a metszeteket nyúl anti-CB1-R (1:2,500), nyúl anti-DGL- α (1:1,000) vagy tengerimalac anti-NAPE-PLD antitesttel (1:200) inkubáltuk 2 napig 4 °C-on, majd 1 nm-es arany szemcséhez kötött, kecskében termelt anti-nyúl vagy anti-tengerimalac IgG-t kapcsoltunk a primer antitesthez. 2,5%-os glutáraldehiddel történő utófixálást követően a metszeteket többször átmostuk, majd a szekunder antitesthez konjugált arany szemcséket ezüst intenzifikáló reagenssel tettük láthatóvá. Ezt követően a metszeteket 1%-os ozmium-tetroxiddal 45 percig kezeltük, majd felszálló alkoholsorban és propilén-oxidban víztelenítettük, Durcupan ACM műgyantába ágyaztuk, végül tárgylemezre helyeztük és a műgyantával lefedtük. A legszebb jelölést mutató metszetekből kivágtuk a hátsó szarvat, amelyet műanyag kapszulában újra beágyaztunk Durcupan ACM műgyantába. A műgyanta polimerizációja után az újraágyazott metszetekből

ultravékony (60 nm) sorozatmetszeteket készítettünk, amelyeket Formvar-hártyával fedett, nikkel „slot” grid-ekre szedtünk fel és uranil-acetáttal, illetve ólom-nitráttal kontrasztoltunk meg.

Kontrollok

A CB1-R ellen termeltetett antitest specificitásának ellenőrzésére CB1-R génkiütött egér és vad típusú egér gerincvelői metszetein végeztük el az immunfestést a korábban leírt egyszeres immunfestési protokollnak megfelelően. A CB1-R génkiütött állat gerincvelői metszetei semmilyen immunfestődést nem mutattak, míg a vad típusú egér gerincvelőjében a patkány gerincvelőben tapasztalható CB1-R immunreakcióval azonos immunfestést figyeltünk meg.

Az álnegatív immunreakció kizárására megismételtük a CB1-R és CGRP kettős immunfestést úgy, hogy az eredetileg 1:5,000-ben hígított CB1-R antitestet 1:1,000-ben hígítva alkalmaztuk. A CB1-R és CGRP közötti kolokalizáció kvantitatív elemzését a korábban megadott kritériumok alapján végeztük. Nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a kolokalizációs értékekben hígabban illetve töményebben alkalmazott CB1-R antitest esetében.

A DGL- α ellen termeltetett antitest specificitásának tesztelésére gerincvelői metszeteket kettősen festettünk a vizsgálataink során alkalmazott anti-DGL- α antitesttel (epitóp: 790-908 aminosav), illetve egy másik anti-DGL- α antitesttel, melyet a DGL- α fehérje másik epitópja ellen termeltettek (epitóp: 1001-1042 aminosav). A két antitest teljesen megegyező immunfestést mutatott.

Az anti-NAPE-PLD antitest specificitásának tesztelésére NAPE-PLD génkiütött illetve vad típusú egerek gerincvelői metszetein végeztünk DAB alapú immunfestést a korábban leírt egyszeres immunhisztokémiai protokollnak megfelelően. A NAPE-PLD génkiütött egér gerincvelői metszetein nem tapasztaltunk immunfestést, míg a vad típusú egér gerincvelője a patkány gerincvelőn megfigyelhető NAPE-PLD immunreaktivitással megegyező mintázatot mutatott.

Az anti-CB1-R, anti-DGL- α és anti-NAPE-PLD antitestek általános jellemzésére Western blot elemzést végeztünk. A patkányokat nátrium-pentobarbitállal altattuk, és eltávolítottuk a gerincvelő L3-L5 szegmentumait. A lumbális gerincvelők hátsó szarvait először proteáz inhibitorral (EDTA, EGTA, PMSF, benzamidin, pepstatin A, leupeptin, aprotinin) kiegészített 20 mM TRIS-ben (pH 7,4) ultrahangos módszerrel feltártuk, majd a sejttörmelékét centrifugálással eltávolítottuk. Ezután a felülúszót leöntve, az üledéket 2% Triton-X 100-at tartalmazó lízis pufferben (20 mM TRIS, 137 mM NaCl, pH 7,4) feloldottuk, majd 12000 g-n 4 °C-on 20 percig centrifugáltuk. A felülúszót redukáló mintapufferben feloldottuk és sávonként 35 μ g fehérjét vittünk fel, amit 10%-os SDS-poliakrilamid gélen megfuttattunk (a Laemmli-módszer szerint). Az elválasztott fehérjéket elektroforetikusan vittük át PVDF membránra, és az egyszeres immunfestési protokollban leírtaknak megfelelően végeztük el az immunreakciót. Az immunfestés mindhárom antitest esetén egy-egy immunreaktív sávot mutatott 53, 115 és 46 kDa magasságában, ami megfelel a CB1-R, DGL- α és NAPE-PLD móltömegének.

Tekintettel arra, hogy kísérleteinkben az IB4-t használtuk a nem-peptiderg primer afferensek axonterminálisainak markeréül, fontos megjegyezni, hogy néhány korábbi közleményben az asztrociták és mikroglia sejtek IB4 kötését is leírták. Ezekkel a leírásokkal szemben, mi sosem tapasztaltunk IB4 kötődést gliasejtekhez.

Az immunfestési protokollunk megbízhatóságának tesztelésére úszó metszeteket inkubáltunk az egyszeres immunfestési eljárásnak megfelelően úgy, hogy a primer antitestet 1%-os normál kecske szérummal helyettesítettük. Ezeken a metszeteken nem tapasztaltunk semmilyen immunfestődést.

EREDMÉNYEK

A CB1-R immunreaktivitásának megoszlása a gerincvelő felületes hátsó szarvában

A peroxidáz alapú egyszeres immunfestés erőteljes CB1-R immunreaktivitást mutatott a lumbális gerincvelőben, amely egy jellegzetes kettős sáv formájában döntően az I. laminára és a II. lamina belső részére (IIi) korlátozódott. A két erőteljesen immunfestett sávot egy gyengébb immunreakciót mutató terület választotta el, amely megfelelt a II. lamina külső részének (IIo). Mind az erőteljesen, mind a gyengébben immunfestett laminákban az immunfestődés pontszerű profilok formájában jelentkezett, de sosem tapasztaltunk sejttest vagy dendrit festődést.

Az immunfestődés jellegzetes mintázata az I-II. laminákban a lumbális gerincvelő teljes rostromaudális kiterjedésében megfigyelhető volt, kivéve az L4-es szegmentumot és az ezzel szomszédos, L3 illetve L5 szegmentumokhoz tartozó területeket. Ebben a magasságban, amely a hátsó végtag talpi felszínéről fogadja a primer afferens bemeneteket, a IIi lamina erőteljes immunfestődése csupán laterálisan volt megfigyelhető, miközben a IIi lamina mediális részében tapasztalható immunreaktivitás intenzitása a IIo lamina immunfestődésével mutatott hasonlóságot.

A CB1-R immunreaktivitás kolokalizációja nociceptív primer afferensek markereivel

Általánosan elfogadott, hogy a nociceptív primer afferensek egy részéből a szinaptikus transzmisszió kapcsán kizárólag glutamát szabadul fel, míg mások a glutamát mellett neuropeptideket is felszabadítanak. A peptiderg primer afferensek döntő többsége CGRP-t tartalmaz, míg a nem-peptiderg primer afferensek terminálisai nagy affinitással kötik az IB4-t. Ezért a CB1-R expresszióját a primer afferensek terminálisain a CB1-R immunreaktivitásának a CGRP immunfestődéssel, illetve az IB4-kötéssel való kolokalizációja alapján vizsgáltuk.

Korábbi tanulmányoknak megfelelően erőteljes CGRP immunfestődést tapasztaltunk a gerincvelő I-IIo lamináiban. A CB1-R és CGRP immunreaktivitás kolokalizációjának elemzésével azt találtuk, hogy a CB1-R immunreaktív foltok 16.74 ± 1.55 és $18.15 \pm 0.84\%$ -a (az anti-CB1-R antitest 1:5,000 hígításakor), illetve 17.62 ± 0.77 és $17.49 \pm 0.87\%$ -a (az anti-CB1-R antitest 1:1,000 hígításakor) mutatott CGRP immunreaktivitást is, miközben a CGRP immunreaktív foltok 46.36 ± 2.54 és $49.10 \pm 0.80\%$ -a (az anti-CB1-R antitest 1:5,000

hígításakor), illetve 44.35 ± 2.31 and $47.51 \pm 0.68\%$ -a (az anti-CB1-R antitest 1:1,000 hígításakor) mutatott CB1-R immunreakciót is a hátsó szarv mediális és laterális részében.

Korábbi leírásoknak megfelelően az IB4 kötődés nagy számban jelölt axonterminálisokat a III laminában. Habár a CB1-R immunfestődés intenzitása jelentős különbséget mutatott a III lamina mediális és laterális részeiben, a CB1-R immunreaktivitás és az IB4 kötődés kolokalizációja meglepően hasonlóan adódott mediálisan és laterálisan: a CB1-R immunreaktív foltok 21.56 ± 1.48 és $18.55 \pm 0.92\%$ -a mutatott IB4 kötődést is, míg az IB4-kötő axonterminálisok 20.94 ± 1.72 és $21.66 \pm 1.56\%$ -a bizonyult CB1-R immunreaktívnek is hátsó szarv mediális és laterális részében.

A CB1-R immunreaktivitás kolokalizációja glutamaterg és GABAerg gerincvelői interneuronok axonterminálisainak markereivel

Korábbi kísérletes eredmények alapján a VGLUT2 nagy biztonsággal jelöli a serkentő gerincvelői interneuronok axonterminálisait. Ismert ugyanakkor, hogy a GABAerg neuronok a GABA szintézisét GAD segítségével végzik. A gerincvelői GABAerg neuronok a GAD mindkét izoformáját (GAD65 és GAD67) tartalmazzák, jóllehet változó arányban. Ezért a CB1-R expresszióját a glutamaterg és GABAerg gerincvelői interneuronok axonterminálisain a CB1-R immunreaktivitás, illetve a VGLUT2 vagy GAD65/67 immunfestés kolokalizációja alapján vizsgáltuk.

Irodalmi adatokkal megegyezően, kísérleteinkben a VGLUT2-immunreaktív axonterminálisok homogén megoszlását tapasztaltuk az I-II. laminákban. A CB1-R immunreaktivitás I-II. laminákban mediálisan és laterálisan tapasztalható jelentős különbsége ellenére a CB1-R és VGLUT2 immunreaktivitás kolokalizációját csaknem azonos mértékűnek találtuk a gerincvelő felületes hátsó szarvának teljes mediolaterális kiterjedésében. Eredményeink alapján a CB1-R immunreaktív foltok 28.93 ± 0.70 és $28.71 \pm 1.19\%$ -a festődött VGLUT2-re is, míg a VGLUT2 pozitív profilok 33.60 ± 1.34 és $36.28 \pm 0.96\%$ -a mutatott CB1-R immunreakciót is a hátsó szarv mediális és laterális részében.

Korábbi közleményekkel egybehangzóan homogén GAD65/67 immunreaktivitást tapasztaltunk a gerincvelő felületes hátsó szarvában. A CB1-R és GAD65/67 immunreaktivitás kolokalizációjának vizsgálatakor a CB1-R immunreaktív foltok 9.22 ± 1.01 és $10.88 \pm 1.08\%$ -a bizonyult GAD65/67 immunreaktívnek is, miközben a GAD65/67 pozitív

axonterminálisok 22.22 ± 1.79 és $17.2 \pm 0.89\%$ -a mutatott CB1-R immunfestődést is a hátsó szarv mediális és laterális részében.

A CB1-R immunreaktivitás kolokalizációja asztrocita és mikroglia sejtek markereivel

Az utóbbi években több közlemény szolgáltatott közvetlen kísérletes bizonyítékot a neuronok és gliasejtek között megvalósuló kétirányú kommunikációra. Kísérletes adatok bizonyítják a CB1-R expresszióját mikroglia sejteken az agykéregben, illetve asztrocitákon a hippocampusban, nucleus caudatusban és a gerincvelőben is. Bizonyítást nyert az is, hogy a neuronok által felszabadított endogén kannabinoid ligandok aktiválhatják az asztrociták CB1 receptorait, és ennek következményeként az asztrociták glutamátot szabadítanak fel, amely a neuronok NMDA receptorait aktiválja. Mivel ez a mechanizmus lehetőséget teremt arra, hogy a gliasejtek részt vegyenek a hátsó szarvi neuronhálózatok működésének modulálásában, részletesen vizsgáltuk a CB1-R expresszióját asztrocitákon és mikroglia sejteken, melyeket GFAP illetve CD11b immunreaktivitásuk alapján azonosítottuk.

Mind a GFAP, mind a CD11b esetében erőteljes immunfestést tapasztaltunk a gerincvelő felületes hátsó szarvában, amely megegyezett a korábbi irodalmi adatokkal. A CB1-R és GFAP immunreaktivitás kolokalizációjának vizsgálatakor úgy találtuk, hogy a CB1-R immunreaktív foltok 7.98 ± 0.57 és $9.66 \pm 0.71\%$ -a mutatott GFAP immunfestődést is, míg a GFAP pozitív profilok 45.61 ± 2.66 és $47.87 \pm 1.42\%$ -ában tapasztaltunk CB1-R immunfestődést is a hátsó szarv mediális és laterális részében. Jelentős kolokalizációt találtunk a CB1-R és CD11b immunreaktivitás között is. A CB1-R immunreaktív foltok 10.42 ± 0.78 és $12.66 \pm 1.27\%$ -a festődött CD11b-vel is, miközben a CD11b pozitív profilok 70.27 ± 0.64 és $78.79 \pm 1.23\%$ -a mutatott CB1-R immunreaktivitást a felületes hátsó szarv mediális és laterális részében.

A CB1 receptorok megoszlása preszinaptikus axonterminálisok és glianyúlványok membránján

Miután jelentős kolokalizációt tapasztaltunk a CB1-R, illetve a különböző axonális és gliális markerek között, szubcelluláris szinten is megvizsgáltuk a CB1-R lokalizációját axonterminálisokon és glianyúlványokon a preembedding nanogold módszerrel immunfestett ultravékony metszeteken. A CB1-R-t jelölő ezüstszemcséket kizárólag axonterminálisokon és

glianyúlványokon sikerült azonosítani, dendriten vagy sejttesten nem tapasztaltunk immunfestést. A CB1-R immunreaktív axonterminálisok mind aszimmetrikus, mind szimmetrikus szinaptikus kapcsolatok kialakításában részt vettek. A CB1 immunfestődést mutató, aszimmetrikus szinaptikus kontaktust kialakító axonterminálisok egy része csak szferoid, más része a szferoid mellett dense core vezikulákat is tartalmazott, miközben a szimmetrikus szinaptikus kontaktust kialakító axonterminálisok pleomorf vezikulákat tartalmaztak. Igen gyakran sikerült immunfestett glianyúlványokat megfigyelni. Sok esetben az immunfestett glianyúlványok CB1-R immunreaktív axonterminálisok és posztszinaptikus dendritek közötti szinaptikus kapcsolat közvetlen közelében helyezkedtek el. Az ezüstszemcsék minden esetben a plazmamembránhoz szorosan kapcsolódtak, függetlenül attól, hogy a jelölt struktúra axonterminálishoz vagy gliasejthez tartozott. Az plazmamembránhoz kapcsolódó ezüst partikulumok extraszinaptikus membránkompartimenteket jelöltek, szinaptikus appozíciókhoz közel vagy távolabb egyaránt, azonban sosem találtunk immunfestést a szinaptikus appozícióban.

A DGL- α és NAPE-PLD immunreaktivitás megoszlása a gerincvelő felületes hátsó szarvában

A DGL- α immunreaktivitás megoszlásának vizsgálatát a gerincvelő I-II. lamináiban a korábban leírt egyszeres immunfestési eljárás segítségével vizsgáltuk. Mind a peroxidáz alapú, mind a fluoreszcens immunfestés erőteljes DGL- α immunreaktivitást mutatott a gerincvelő felületes hátsó szarvában. A II. lamina erőteljesen festett sávként jelent meg a gerincvelő keresztmetszetén, míg az I. és a mélyebb laminák gyengébb immunfestődést mutattak. Az immunfestett elemek pontszerű profilokként jelentek meg mind az erősebben, mind a gyengébben festett területeken. A pontszerű immunfestődés mellett mind a szürke-, mind a fehérállományban nagyobb méretű immunreaktív foltok is jelentkeztek, melyek feltehetően neuronok vagy gliasejtek sejttesteit jelölték.

A NAPE-PLD immunreaktivitás megoszlásának vizsgálatára egyszeres immunfestést végeztünk gerincvelői metszeteken a korábban leírt egyszeres immunhisztokémiai protokollnak megfelelően. A peroxidáz alapú és a fluoreszcens immunfestések egyaránt pontszerű mintázatot mutattak, melynek denzitása a gerincvelő teljes keresztmetszetén, beleértve az I-II. laminákat, többé-kevésbé azonosnak mutatkozott. A DGL- α -hoz hasonlóan, a NAPE-PLD immunfestés esetében is megfigyelhetők voltak immunreaktív neuronális vagy gliális sejttestek.

A DGL- α és NAPE-PLD immunreaktivitás kolokalizációja nociceptív primer afferensek markereivel

A korábban leírtaknak megfelelően, a peptiderg nociceptív primer afferensek CGRP-t expresszálnak, míg a nem peptiderg primer afferensek axonterminálisainak sejtmembránja nagy affinitással köti az IB4-t. Ezért a DGL- α és NAPE-PLD expresszióját a peptiderg és nem peptiderg primer afferensek centrális axonterminálisain az enzimek és a CGRP immunreaktivitás, illetve az IB4 kötés kolokalizációja alapján vizsgáltuk.

A DGL- α és CGRP immunreaktivitás kolokalizációjának elemzéséhez 703 CGRP-pozitív és 1,224 DGL- α immunreaktív profilt vizsgáltunk meg, a DGL- α immunreaktív foltoknak csupán $1.96 \pm 0.78\%$ -a volt CGRP pozitív, miközben a CGRP immunreaktív terminálisoknak csak $3.41 \pm 1.11\%$ -a bizonyult DGL- α pozitívnak a hátsó szarv I-II. lamináiban. Ha lehet, a kolokalizációs értékek a NAPE-PLD esetén még alacsonyabbnak bizonyultak. 760 CGRP pozitív és 1,304 NAPE-PLD immunreaktív profil alapos vizsgálatával úgy találtuk, hogy a NAPE-PLD immunreaktív foltoknak mindössze az $1.69 \pm 0.91\%$ -a festődött NAPE-PLD-re is, illetve a CGRP immunreaktív axonterminálisoknak $1.97 \pm 0.76\%$ -a mutatott NAPE-PLD pozitivitást a gerincvelő felületes hátsó szarvában.

A DGL- α immunreaktivitás és az IB4 kötés jelentős lamináris átfedése ellenére igen alacsony mértékű kolokalizációt találtunk a DGL- α illetve NAPE-PLD immunreaktivitás, és az IB4-kötő axonterminálisok között. Összesen 660 IB4-kötő és 1,490 DGL- α immunfestett profil vizsgálata azt mutatta, hogy a DGL- α immunreaktív profiloknak $2.48 \pm 0.99\%$ -a kötött IB4-t, illetve az IB4-kötő axonterminálisoknak $1.06 \pm 0.79\%$ -a festődött DGL- α -val is. Hasonló képet kaptunk a NAPE-PLD esetében is, hiszen 737 IB4-kötő és 1,355 NAPE-PLD immunreaktív profil alapos elemzésével a NAPE-PLD pozitív profiloknak a $1.92 \pm 0.88\%$ -a kötött IB4-t is, és az IB4-kötő boutonoknak $2.43 \pm 0.91\%$ -a mutatott pozitivitást NAPE-PLD-re is a gerincvelő felületes hátsó szarvában.

A DGL- α és NAPE-PLD immunreaktivitás kolokalizációja glutamaterg és GABAerg gerincvelői interneuronok axonterminálisai

A korábbi leírásnak megfelelően a VGLUT2 a serkentő gerincvelői interneuronok axonterminálisainak, míg a GAD két izoformája a GABAerg interneuronok axonterminálisainak specifikus markereként alkalmazható. Ezért a DGL- α és NAPE-PLD expresszióját a glutamaterg és GABAerg gerincvelői interneuronok axonterminálisain az enzimek és a VGLUT2, illetve GAD65/67 immunreaktivitás kolokalizációja alapján vizsgáltuk.

Az enzimek és a VGLUT2 immunreaktivitás közötti kolokalizáció mértéke igen alacsonynak bizonyult, bár kissé magasabbnak, mint a primer afferens axonterminálisainak esetében tapasztaltuk. Mindösszesen 725 VGLUT2 és 1,508 DGL- α immunreaktív profil tanulmányozásával a DGL- α pozitív profiloknak $3.78 \pm 0.59\%$ -a festődött VGLUT2-vel is, és a VGLUT2 pozitív axonterminálisoknak $6.76 \pm 0.47\%$ -a mutatott DGL- α immunreaktivitást.

A NAPE-PLD esetében a kolokalizáció mértéke még alacsonyabbnak bizonyult. A gerincvelő I-II. lamináiban 681 VGLUT2 és 1,526 NAPE-PLD immunreaktív folt elemzése után a NAPE-PLD immunreaktív profiloknak $2.23 \pm 1.67\%$ -a mutatott VGLUT2 pozitivitást is, illetve a VGLUT2 pozitív axonterminálisoknak $3.96 \pm 1.31\%$ -a festődött NAPE-PLD-re is.

A DGL- α és a GAD65/67 immunreaktivitás kolokalizációjának elemzéséhez 641 GAD65/67 és 1,388 DGL- α immunreaktív profilt gyűjtöttünk össze. Eredményeink alapján a DGL- α immunreaktív profiloknak $2.16 \pm 0.43\%$ -a mutatott GAD65/67 pozitivitást, és a GAD65/67 immunreaktív axonterminálisoknak $3.12 \pm 0.93\%$ -a volt DGL- α immunreaktív.

Hasonló képet láttunk a NAPE-PLD esetében is. Az összeszámolt 707 GAD65/67 és 1,431 NAPE-PLD immunreaktív folt vizsgálatkor a NAPE-PLD immunreaktív profiloknak $0.91 \pm 0.7\%$ -a festődött GAD65/67-tel is, míg a GAD65/67 pozitív profiloknak $2.11 \pm 1.06\%$ -a bizonyult NAPE-PLD immunreaktívnek a hátsó szarv I-II. lamináiban.

A DGL- α és NAPE-PLD immunreaktivitás kolokalizációja asztrociták és mikroglia sejtek markereivel

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy mind az asztrociták, mind a mikroglia sejtek képesek anadamidot és 2-AG-t felszabadítani in vitro. Tekintettel arra, hogy az endokannabinoid ligandok szerepet játszhatnak a gerincvelői szintű fájdalomfeldolgozásban,

részletesen vizsgáltuk a DGL- α és NAPE-PLD expresszióját asztrocitákon és mikroglia sejteken, melyeket GFAP illetve CD11b immunreaktivitásuk alapján azonosítottuk.

A DGL- α és a GFAP immunreaktivitás kolokalizációjának vizsgálatához 216 GFAP és 1,321 DGL- α immunreaktív profilt gyűjtöttünk össze. Eredményeink alapján a DGL- α immunreaktív foltoknak $9.39 \pm 1.96\%$ -a mutatott GFAP pozitivitást, míg a GFAP pozitív profiloknak $33.33 \pm 2.06\%$ -a volt DGL- α immunreaktív. Jelentős mértékű kolokalizációt találtunk a DGL- α és a CD11b immunreaktivitás kolokalizációjának vizsgálatakor. Összesen 207 CD11b és 1,297 DGL- α pozitív profil elemzése után úgy találtuk, hogy a DGL- α immunreaktív foltoknak $29.53 \pm 1.19\%$ -a mutatott CD11b pozitivitást, illetve a CD11b immunreaktív profiloknak $67.15 \pm 2.21\%$ -a mutatott DGL- α immunfestődést.

A NAPE-PLD és a gliális markerek közötti kolokalizációs értékek esetében jelzetten magasabb expressziós szinteket találtunk, mint a DGL- α és a megfelelő gliális marker vonatkozásában. A megvizsgált 241 GFAP és 1,406 NAPE-PLD pozitív profil alapján a NAPE-PLD immunreaktív foltoknak $12.52 \pm 2.15\%$ -a mutatott GFAP pozitivitást is, míg a GFAP pozitív profiloknak $54.77 \pm 1.98\%$ -a mutatott NAPE-PLD immunfestődést. Vizsgáltunk továbbá 223 CD11b és 1,501 NAPE-PLD immunreaktív profilt, és úgy találtuk, hogy a NAPE-PLD immunfestett foltoknak $32.11 \pm 2.30\%$ -a mutatott CD11b festődést is, illetve a CD11b pozitív profiloknak a $75.34 \pm 2.60\%$ -a bizonyult NAPE-PLD immunreaktívnek is a gerincvelő felületes hátsó szarvában.

A DGL- α és NAPE-PLD immunreaktivitás ultrastrukturális lokalizációja

A DGL- α és a NAPE-PLD szubcelluláris megoszlását preembedding peroxidáz alapú és nanogold módszerrel immunfestett ultravékony metszeteken vizsgáltuk. A korábban bemutatott minimális átfedést a DGL- α és a NAPE-PLD, illetve az axonális markerek között, illetve a jelentős kolokalizációt az enzimek és a gliális markerek között sikerült megerősíteni az ultrastrukturális vizsgálatok segítségével. Mivel azonban a DGL- α és NAPE-PLD immunreaktív foltoknak nagyjából a felét sikerült az axonális és gliális markerek segítségével azonosítani, az elektronmikroszkópos vizsgálatokban kiemelt figyelmet fordítottunk az enzimek immunreaktivitásának azonosítására a neuronok szomatodendritikus kompartmentjében.

A kolokalizációs vizsgálataink eredményeivel összhangban, a DGL- α és NAPE-PLD lokalizációját jelző peroxidáz reakció végtermékét, illetve ezüstszemcséket elsődlegesen dendriteken és gliasejteken sikerült azonosítani, míg axonális immunreakció elvéte mutatkozott az általunk vizsgált ultravékony metszetekben.

A DGL- α immunjelölést kizárólag a plazmamembránnal szoros kapcsolatban tudtuk azonosítani függetlenül attól, hogy a jelölt membránkompartiment dendrithez, axonhoz vagy gliasejthez tartozott. A dendritekben a DGL- α immunreaktivitást jelző immunprecipitátum illetve nanogold partikulum szinte kizárólag ott volt megfigyelhető, ahol a dendritek szinaptikus bemeneteket fogadtak különböző morfológiájú axonterminálisoktól.

A preszinaptikus axonterminális morfológiájától függetlenül a DGL- α immunjelölés minden esetben a szinaptikus appozíció közvetlen közelében helyezkedett el. Nanogold jelöléseink segítségével a DGL- α aszimmetrikus szinaptikus kontaktusokban periszinaptikusan sikerült azonosítani.

A DGL- α -hoz hasonlóan, a NAPE-PLD immunreaktivitását jelző precipitátum a neuronok dendritikus kompartmentjében, a membrán belső felszínén volt azonosítható. A NAPE-PLD pozitív membránszakaszok azonban jellemzően nem a szinaptikus appozíciók közelében helyezkedtek el, jóllehet ezen megfigyelés megbízhatóságát korlátozza, hogy megfigyeléseinket nem sorozatmetszetek, hanem egyedi metszeteket vizsgálatára alapoztuk.

Axonterminálisokban elvéte sikerült akár DGL- α , akár NAPE-PLD immunreaktivitást kimutatni. Az esetek egy részében a jelölt axonszegmentum szinaptikus appozíció közelében helyezkedett el, más esetekben azonban nem sikerült a környéken szinaptikus kontaktust azonosítani.

Glianyúlványok esetében mind a DGL- α , mind a NAPE-PLD erőteljes immunfestést mutatott. Általánosan megfigyelhető volt, hogy a glianyúlványok membránjának csak bizonyos szakaszai mutattak immunreaktivitást, miközben az ugyanazon nyúlványhoz tartozó szomszédos membránkompartiment semmiféle jelölést nem mutatott. A glianyúlványokon megfigyelhető DGL- α immunreakció a legtöbb esetben axonterminálisok és a hozzájuk tartozó DGL- α immunreaktív posztzinaptikus dendritek közvetlen közelében lokalizálódott. Ezzel szemben a NAPE-PLD immunreaktív gliális membránkompartimentek közelében jellemzően olyan dendritszakaszok voltak megfigyelhetők, melyek nem jelölődtek NAPE-

PLD-vel. NAPE-PLD pozitív glianyúlványokat néhány esetben sikerült a szinaptikus appozíciók közelében kimutatni.

MEGBESZÉLÉS

CB1-R expressziója nociceptív primer afferensek centrális axonterminálisain

A CB1-R lokalizációja a nociceptív információfeldolgozásban szerepet játszó centrális és perifériás neuronokon arra enged következtetni, hogy az endokannabinoid rendszer egyik fontos funkciója lehet a fájdalomfeldolgozás modulálása. Ezzel összhangban kísérletes eredmények bizonyítják, hogy a kannabinoidok képesek mérsékelni a fájdalmas ingerekre adott magatartási válaszreakciókat, továbbá elektrofiziológiai és neurokémiai kísérletek bizonyítják, hogy a kannabinoidok antinociceptív hatásaiért a gerincvelői neuronok fájdalmas stimulussal kiváltott aktivitásának kannabinoid-mediált csökkentése felelős, melyet legalább részben a C és A δ nociceptív afferenseken expresszáldó CB1-R aktiválása okoz.

Funkcionális CB1-R jelenlétét gerincvelői interneuronok és primer afferensek terminálisain irodalmi adatok támasztják alá, azonban a CB1-R expresszió mértékét ezen axonterminálisokon az egymásnak ellentmondó irodalmi adatok alapján nem könnyű megítélni. Kísérletes eredmények bizonyítják, hogy dorzális rizotómiát követően a CB1-R immunreaktivitás jelzett csökkenése figyelhető meg csupán a gerincvelő felületes hátsó szarvában, más közlemények azonban dorzális rizotómiát követően a kannabinoid ligandok kötődésnek 50%-os csökkenéséről számolnak be. Elektrofiziológiai eredmények szintén arra utalnak, hogy a primer afferensek jelentős része reagál endokannabinoid felszabadulásra a gerincvelőben.

Jelen eredményeink a CB1-R immunreaktív foltok megoszlásának kvantitatív elemzése kapcsán a gerincvelő felületes hátsó szarvában segíthetnek tisztázni az egymásnak ellentmondó irodalmi adatokat. Egyrészt a peptiderg primer afferens terminálisoknak közel felén, a nem peptiderg primer afferens boutonoknak pedig a negyedén sikerült CB1-R immunreaktivitást kimutatnunk, ami jó összhangban van az elektrofiziológiai és a radioligand jelöléses kísérletek eredményeivel. Másrészt azonban fontos megjegyezni, hogy nem sikerült CB1-R immunfestést kimutatni a peptiderg primer afferens terminálisok felén, illetve a nem peptiderg primer afferensek terminálisainak csaknem 80%-án jelezve, hogy a preszinaptikus kannabinoid moduláció hatásfoka különböző primer afferens csoportok esetében széles skálán mozoghat. További vizsgálatok tisztázhatják, milyen típusú primer afferensek állnak

kannabinoid moduláció alatt, és melyek azok, amelyek nem állnak kannabinoid rendszer ellenőrzése alatt.

CB1-R expressziója gerincvelői interneuronok axonterminálisain

Korábbi, neonatálisan kapszaicinnal kezelt patkányokon végzett autoradiográfiás vizsgálatok szerint a gerincvelői CB1 receptoroknak csupán 16%-a található C-rostok centrális terminálisain, azaz a gerincvelő felületes hátsó szarvában expresszáldó CB1-R valószínűleg gerincvelői interneuronok axonterminálisain helyezkednek el. Ezt támasztja alá az is, hogy funkcionális vizsgálatokban a CB1-R mediált preszinaptikus mechanizmusok a glutamaterg és GABAerg neurotranszmissziót egyaránt gátolják. Minezek az irodalmi adatok alátámasztják jelen eredményeinket.

A CB1-R expressziója gerincvelői interneuronokon általánosan elfogadott, a CB1-R megoszlása a gerincvelő hátsó szarvi neuronok szomatodendritikus és axonális kompartmentjében továbbra sem tisztázott. A legtöbb morfológiai közlemény a CB1-R-t a gerincvelői interneuronok szómáján és dendritikus kompartmentjében azonosítja, miközben fiziológiai és farmakológiai kísérletek, melyekben kannabinoid ligandokat alkalmaznak gerincvelői szeletpreparátumokon, rendre preszinaptikus CB1-R mediált mechanizmusokat támasztanak alá. Eredményeink megerősítik a funkcionális tanulmányokból következő feltételezéseket, hiszen CB1-R immunreakciót egyáltalán nem sikerült a neuronok szomatodendritikus kompartmentjében azonosítani, azonban nagy számban találtunk CB1-immunreaktív serkentő és gátló axonterminálist egyaránt. Azonban a primer afferensek termináliaihoz hasonlóan a glutamaterg interneuronok axonterminálisainak 60%-ám, míg a GABAerg interneuronok boutonjainak 80%-án nem sikerült CB1-R immunfestést kimutatni a gerincvelő felületes hátsó szarvában jelezve, hogy a kannabinoid mechanizmusok a gerincvelői interneuronok axonterminálisainak csupán kis hányadát modulálhatják. Megjegyzendő, hogy a VGLUT2 immunreaktív axonterminálisok kis része primer afferensek axonterminálisait jelölheti, ami a serkentő interneuronok CB1-R expresszióját jellemző kolokalizációs adataink vonatkozásában minimális pontatlanságot eredményezhet.

CB1 receptorok expressziója gliasejteken

Az utóbbi években egyre inkább elfogadottá vált a neuronok és gliasejtek közötti kétirányú kommunikáció, beleértve a neuron-asztrocita és neuron-mikroglia interakciókat is.

Kísérletes eredmények bizonyítják, hogy hippocampális asztrociták CB1-R-t expresszálnak, melyek aktivációja az asztrocitákban PLC-függő módon Ca^{2+} tranzienszt vált ki. A megnövekedett Ca^{2+} koncentráció glutamát felszabadulást vált ki az asztrocitákból, és a felszabaduló glutamát a neuronok NMDA receptorait képes aktiválni. A mikroglia sejteken expresszáldó CB1-R-ok szintén lényeges szerepet tölthetnek be a központi idegrendszerben a citokinek és kemokinek felszabadításának szabályozásán keresztül. A telencephalonon kívül a gerincvelő felületes hátsó szarvában is leírták már CB1 receptorokat expresszáló asztrociták jelenlétét.

Korábbi vizsgálatokkal összhangban azt találtuk, hogy az asztrocitáknak közel a fele, a mikroglia sejteknek pedig csaknem a 80%-a expresszál CB1-R-t a gerincvelő I-II. lamináiban. Ugyan a gliális CB1-R jelentősége a gerincvelői szintű fájdalomfeldolgozás modulációjában egyáltalán nem ismert, feltételezhető, hogy az agykéregben leírt mechanizmushoz hasonlóan a gerincvelőben is kiválthatja a gliasejtekből citokinek, kemokinek vagy glutamát felszabadulását, ami hozzájárulhat a gerincvelő hátsó szarvi fájdalomfeldolgozó neuronhálózatok működésének modulálásához.

DGL- α and NAPE-PLD expressziója axonterminálisokon

A DGL- α immunfestődést csak esetenként sikerült kimutatnunk a gerincvelő felületes hátsó szarvában található axonterminálisokban, azok eredetétől függetlenül. Ez jó összhangban van korábbi kísérletes eredményekkel, melyek a DGL- α lokalizációját döntően CB1-R-t expresszáló axonterminálisokkal szemben található posztzinaptikus dendritekben írták le.

A NAPE-PLD ultrastrukturális lokalizációjára vonatkozó eredményeink azonban kevésbé csengenek össze néhány korábbi leírással, melyekben a NAPE-PLD-t túlnyomóan preszinaptikusan mutatták ki, serkentő neuronok axonterminálisaiban található intracelluláris Ca^{2+} raktárak membránjához asszociáltnak. További kísérletek igazolták a NAPE-PLD expresszióját hátsó gyöki ganglionsejtek sejttestjeiben. Ezzel szemben a mi eredményeink meglepően alacsony axonális NAPE-PLD expressziót mutattak a gerincvelő felületes hátsó szarvában, ami az sugallja, hogy a NAPE-PLD transzportja a hátsó gyöki ganglionsejtek sejttestjeitől, illetve a gerincvelői interneuronok perikaryonjaitól az axonterminálisok felé, hogy az nem éri el az immunhisztokémiai módszerek érzékenységi küszöbét. Eredményeink egyúttal arra utalnak, hogy a gerincvelő szintjén a NAPE-PLD axonális expressziója, és így az axonális anandamid szintézis jelentősége valószínűleg alárendelt.

DGL- α and NAPE-PLD megoszlása dendritekben

Az irodalomban általánosan elfogadott, hogy az idegrendszerben a 2-AG-t a posztzinaptikus neuronok aktivitásfüggő módon mobilizálják. A felszabaduló 2-AG retrográd módon hatva, eléri és aktiválja a preszinaptikus CB1-R-t, amely csökkenti a neurotranszmitter felszabadulás valószínűségét a preszinaptikus terminálisból. Ez az alapmechanizmus felelős a kannabinoid-mediált rövid és hosszú távú plaszticitási folyamatok kialakulásáért. Eredményeink, melyek a DGL- α periszinaptikus dendritikus megoszlását támasztják alá, tökéletesen illeszkednek a korábbi eredmények közé.

Ellentétben a széles körben tanulmányozott 2-AG jelpálya molekuláris anatómiai hátterével, az anandamid mobilizálás hátterében álló molekuláris apparátus szerveződése jórészt ismeretlen, jóllehet az anandamid szerepét egy sor élettani folyamat szabályozásában számos kísérlet igazolja. A kisszámú elérhető irodalmi adat az anandamid szintézisének morfológiai hátteréről ráadásul ellentmondásos, hiszen számos közlemény bizonyítja a NAPE-PLD preszinaptikus lokalizációját serkentő neuronok axonterminálisaiban, miközben mások a NAPE-PLD-t inkább a neuronok szomatodendritikus kompartmentjében azonosították. A mi eredményeink a NAPE-PLD szomatodendritikus expresszióját támasztják alá a gerincvelő felületes hátsó szarvában.

DGL- α and NAPE-PLD expressziója gliasejteken

Korábbi kísérletes eredmények támasztják alá nem csupán az asztrocitákon és mikroglia sejteken expresszáldó funkcionális CB1-R-ok jelenlétét, de azt is, hogy a gliasejtek 2-AG és anandamid felszabadítására is képesek. Eredményeink a DGL-a és NAPE-PLD azonosításával asztrocitákon és mikroglia sejteken tovább valószínűsítik egy endokannabinoid mediált kommunikációs útvonal létét gliasejt-neuron és gliasejt-gliasejt között a gerincvelő felületes hátsó szarvában.

Az endokannabinoid rendszer feltételezett működési mechanizmusa a gerincvelő felületes hátsó szarvában

A gerincvelő felületes hátsó szarvi neuronhálózatok elsődleges aktivitása a nociceptív primer afferens bemenetektől származik, amely szükséges az aktivitásfüggő endokannabinoid szignalizáció indukciójához. A gerincvelői neuronok aktiválódnak a glutamaterg nociceptív primer afferens bemenetektől, és válaszul 2-AG-t szabadítanak fel a periszinaptikus membránkompartimentekből, illetve anandamidot mobilizálnak az extrastinaptikus membránszegmentekből. A felszabaduló endokannabinoid ligandok szétdiffundálnak, és aktiválhatják a primer afferensek, illetve gerincvelői interneuronok axonterminálisain expresszáldó CB1 receptorokat, és ezzel átmenetileg csökkentik a neurotranszmitterek felszabadulásának valószínűségét a CB1-R-t hordozó axonterminálisokból. Ez a folyamat meghatározó mértékben járulhat hozzá a gerincvelői fájdalomfeldolgozó neuronhálózat működésének szabályozásához.

A neuronok mellett asztrociták és mikroglia sejtek is expresszálnak CB1 receptorokat, melyeket ugyancsak a poszt-szinaptikus neuronok által felszabadított endokannabinoid ligandok aktiválhatnak elsődlegesen. A gliális CB1-R aktiváció PLC-függő módon megemeli az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt, amely aktiválhatja az ugyancsak gliasejteken expresszáldó DGL- α -t és NAPE-PLD-t, és ezzel további endokannabinoid felszabadulást eredményezhet a gliasejtekből. A gliasejtekből felszabaduló 2-AG és anandamid, a poszt-szinaptikus neuronok által mobilizált endokannabinoidokkal együtt szabályozhatják a gerincvelő hátsó szarvi neuronhálózat működését.

Habár a gliális endokannabinoid rendszer, és annak hatása a nociceptív információfeldolgozásra még mindig nem ismert kellő mélységben, az asztrociták és mikroglia sejtek CB1-R, DGL-a és NAPE-PLD expresszióját mindenképpen figyelembe kell venni a gerincvelői szintű fájdalomfeldolgozás kannabinoid-modulációjának értelmezésekor.

ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérletes eredmények sora bizonyítja, hogy az endokannabinoid mechanizmusok fontos szerepet játszanak a nociceptív információfeldolgozásban a központi idegrendszer számos területén, így a gerincvelő felületes hátsó szarvában is. Kísérleteinkben a kannabinoid-1 receptor (CB1), illetve a két legfontosabb endokannabinoid-szintetizáló enzim, a diacilglicerol-lipáz-alfa (DGL- α) és az N-acilfoszfatidil-etanolamin-specifikus foszfolipáz D (NAPE-PLD) expresszióját vizsgáltuk a gerincvelő I-II. lamináiban immunhisztokémiai módszerek segítségével, fény-és elektronmikroszkópos szinten egyaránt.

Erőteljes CB1-R immunreaktivitást találtunk axonterminálisokban, de nem sikerült CB1-R-t kimutatni a neuronok szomatodendritikus kompartmentjében. A CB1-R, illetve primer afferensek és gerincvelői interneuron axonterminálisok kolokalizációjának vizsgálatakor azt találtuk, hogy a peptiderg primer afferens terminálisoknak közel a fele, a nem peptiderg primer afferensek boutonjainak pedig több mint 20%-a, a glutamater gerincvelői interneuronok axonterminálisainak az egyharmada, a GABAerg interneuron boutonoknak pedig közel 20%-a expresszál CB1-R-t. A neuronok mellett az asztrocita nyúlványoknak csaknem a fele, míg a mikroglia sejtek közel 80%-a mutatott CB1-R immunfestődést.

A CB1-R immunreaktivitás megoszlásával szemben a DGL- α és NAPE-PLD immunfestődést döntően dendriteken sikerült azonosítani a gerincvelő hátsó szarvában, míg az axonterminálisokon elvértve tudtunk DGL- α vagy NAPE-PLD immunreakciót kimutatni. Miközben a DGL- α immunreaktivitást mindig a dendritek szinapszisok közvetlen közelében található membránszegmentjein azonosítottuk, addig a NAPE-PLD immunpozitív dendritikus membránkompartmentek szinte mindig a szinaptikus appozícióktól távolabb helyezkedtek el. A dendritek mellett az asztrociták és mikroglia sejtek is jelentős mértékben mutattak DGL- α és NAPE-PLD immunfestődést. A DGL- α immunreaktív gliális membránszegmenteket igen gyakran olyan szinapszisok közelében sikerült azonosítani, melynek posztszinaptikus dendritje szintén DGL-a immunreaktívnek bizonyult, míg a NAPE-PLD immunreaktív gliális membránkompartmentek csak esetenként sikerült szinaptikus appozíciók közelében kimutatni.

Eredményeink alapján a gerincvelő felületes hátsó szarvában neuronok és gliasejtek egyaránt képesek 2-AG-t és anandamidot felszabadítani. A 2-AG felszabadulás döntően posztszinaptikus dendritekhez és szinapszisokhoz közeli glianyúlványokhoz köthető, míg az anandamid mobilizációja főleg szinapszisoktól távolabb található dendritekből és gliasejtekből lehetséges. Az endokannabinoid ligandok aktivitásfüggő felszabadulása komplex szignalizációs mechanizmusokat indukálhat a gerincvelő hátsó szarvi fájdalomfeldolgozó neuronhálózatban, melyben a neuronális és gliális endokannabinoid rendszer egyaránt részt vehet.

Iktatószám: DEENKÉTK/162/2013.

Tételszám:

Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Hegyi Zoltán

Neptun kód: PC5PRJ

Doktori Iskola: Idegtudományi Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Hegyi, Z.**, Holló, K., Kis, G., Mackie, K., Antal, M.: Differential distribution of diacylglycerol lipase- α and N-acylphosphatidylethanolamine-specific phospholipase D immunoreactivity in the superficial spinal dorsal horn of rats.
Glia. 60 (9), 1316-1329, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/glia.2235>
IF:4.82 (2011)
2. **Hegyi, Z.**, Kis, G., Holló, K., Ledent, C., Antal, M.: Neuronal and glial localization of the cannabinoid-1 receptor in the superficial spinal dorsal horn of the rodent spinal cord.
Eur. J. Neurosci. 30 (2), 251-262, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06816.x>
IF:3.418

További Közlemények

3. Karosi, T., Csomor, P., **Hegyi, Z.**, Sziklai, I.: The presence of CD209 expressing dendritic cells correlates with biofilm positivity in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis.
Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryn. Epub ahead of print (2013)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00405-013-2372-9>
IF:1.287 (2011)



4. Szalai, E., Felszeghy, S., **Hegyi, Z.**, Módos, L., Berta, A., Kaarniranta, K.: Fibrillin-2, tenascin-C, matrilin-2, and matrilin-4 are strongly expressed in the epithelium of human granular and lattice type I corneal dystrophies.
Mol. Vis. 18, 1927-1936, 2012.
IF:2.205 (2011)

Összesített impakt faktor: 11.73

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 8.238

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2013.05.02



Konferencia absztraktok:

1. **Hegyi Z**, Kis G, Antal M: Neuronal and glial localization of the cannabinoid-1 receptor in the superficial dorsal horn of the rodent spinal cord. *IBRO International Workshop*, Debrecen, 2008.
2. **Hegyi Z**, Kis G, Holló K, Ledent C, Antal M: Neuronal and glial localization of the cannabinoid-1 receptor in the superficial dorsal horn of the rodent spinal cord. *6th FENS Forum*, Geneva, 2008.
3. **Hegyi Z**, Antal M: Reorganization of cannabinoid-1 receptor expression in the superficial spinal dorsal horn of rats in inflammatory pain. *Annual Conference of the Hungarian Neuroscience Society*, 2008.
4. **Hegyi Z**, Holló K, Kis G, Mackie K, Antal M: Differential distribution of DGL-alpha and NAPE-PLD immunoreactivity in the superficial spinal dorsal horn of rodents. *IBRO Workshop*, Pécs, 2010.
5. **Hegyi Z**, Kis G, Holló K, Ledent C, Mackie K, Antal M: Differential distribution of CB1 receptor, DGL-alpha and NAPE-PLD immunoreactivity in the superficial spinal dorsal horn of rodents. *Workshop on the endocannabinoid system*, Bonn, 2010
6. **Hegyi Z**, Kis G, Holló K, Mackie K, Antal M: Differential distribution of DGL-alpha and NAPE-PLD immunoreactivity in the superficial spinal dorsal horn of rodents. *FENS Forum*, 2010, Amsterdam
7. **Hegyi Z**, Kis G, Holló K, Mackie K, Antal M: Differential distribution of diacylglycerol lipase-alpha and N-acyl-phosphatidyl-ethanolamine-hydrolyzing phospholipase D immunoreactivity in the superficial spinal dorsal horn of rodent. *Joint Conference of the LXXV. Meeting of the Hungarian Physiological Society with participation of the Hungarian Society of Anatomists, the Experimental Section of the Hungarian Society for Experimental and Clinical Pharmacology and the Hungarian Society for Microcirculation and Vascular Biology*, Pécs, 2011.
8. **Hegyi Z**, Holló K, Antal M: Co-expression of CB1 receptors and the major endocannabinoid-synthesizing enzymes, DGL- α and NAPE-PLD by astrocytes in the rat spinal cord. *FENS Forum*, 2012, Barcelona
9. Holló K, Ducza L, Bakk E, Hegedus K, **Hegyi Z**, Antal M: Expression And Cellular Localization Of Interleukin-1 Receptor Type-1 In The Spinal Dorsal Horn In The Freund Adjuvant-Evoked Inflammatory Pain. *FENS Forum*, 2012, Barcelona
10. **Hegyi Z**, Oláh T, Docova K, Holló K, Csernoch L, Antal M: Endocannabinoid-mediated calcium signaling in spinal astrocytes. *Annual Conference of the Hungarian Neuroscience Society*, 2013, Budapest

11. Holló K, Gajtkó A, Hegedűs K, Bakk E, **Hegyi Z**, Antal M: IL-1 beta production by cultured spinal cord astrocytes upon LPS treatment is influenced by ATP and glutamate. *Annual Conference of the Hungarian Neuroscience Society*, 2013, Budapest
12. Docova K, **Hegyi Z**, Holló K, Kis G, Mackie K, Antal M: Distribution of monoacylglycerol lipase (MGL) immunoreactivity in the superficial spinal dorsal horn of rodents. *Annual Conference of the Hungarian Neuroscience Society*, 2013, Budapest