

A pályázat célul tűzte ki a gerincvelői nociceptív ingerületfeldolgozást végző érző és a gerincvelői szintű motoros működéseket irányító mozgató neuronhálózatok vizsgálatát. A munkaterv célkitűzéseinek megfelelően kutatási tevékenységünk a következő témák köré csoportosult:

Primer afferensek és gerincvelői hátsó szarvi másodlagos érző neuronok közötti szinaptikus kapcsolatok molekuláris anatómiája

Vizsgáltuk a hyperpolarizáció által aktivált ciklikus nukleotidák által modulált kation csatorna kettes fehérje alegységének (HCN2) expresszióját a gerincvelő hátsó szarvában. Immunhisztokémiai módszerekkel kimutattuk, hogy a felületes hátsó szarv I-IIo laminái erőteljes szemcsés immunreaktivitást mutatnak HCN2-re. Dorsalis rhyzotomia ezt a festődést teljesen megszüntette, arra utalva, hogy a HCN2 immunreaktivitás primer afferensek axon végződéseikhez köthető. Kettős immunfestéses kísérletekben kimutattuk, hogy a HCN2 csatorna fehérjét a primer afferensek közül is szinte kizárólag P-anyagot tartalmazó nociceptív primer afferensek terminálisai fejezik ki. Megerősítették ezt a leletünket elektronmikroszkópos vizsgálataink is. A preembedding nanogold módszert használva azt találtuk, hogy a HCN2 immunreaktivitást elsődlegesen, ha nem kizárólagosan, dense-core vesiculákat tartalmazó axon terminálisok mutatják. Érdekes megfigyelésünk, hogy a HCN2 fehérje csak extraszinaptikus membrán területekhez kötődik, szinaptikus membránokban a fehérjét sohasem sikerült kimutatnunk. Leírtuk továbbá, hogy a HCN2-t kifejező axon terminalisok elsősorban NK1-R, GluR2, MOR és calbindin immunreaktív serkentő, és kisebb számban GAD65 immunreaktív gátló interneuronokkal képeznek kapcsolatokat. Igazoltuk, hogy a HCN csatornák aktivitása növeli a primer afferensek és a másodlagos gerincvelői interneuronok közötti szinaptikus transzmisszió megbízhatóságát. Eredményeink továbbá azt is valószínűsítik, hogy a HCN2 fehérje által képzett ioncsatornák hozzájárulhatnak a gerincvelőben végződő P-anyag tartalmú peptiderg nociceptív primer afferens terminalisok membrán potenciáljának és excitabilitásának modulációjában is.

Vizsgáltuk a cannabinoid 1 (CB1) receptor expresszióját a gerincvelő hátsó szarvában egyszeres és többszörös immunhisztokémiai jelölések segítségével. Úgy találtuk, hogy a CB1 receptor erőteljes kifejeződést mutat a felületes hátsó szarvban, ahol a nociceptív primer afferensek végződnek. Sikerült kimutatnunk azt is, hogy mind a peptiderg, mind a nem-peptiderg nociceptív primer afferensek centralis terminalisainak egy része expresszálja a CB1 receptort, ami alapján feltételezhető, hogy endogen cannabinoidok aktivitás függő felszabadulása jelentős mértékben befolyásolja a nociceptív ingerületeknek a gerincvelői másodlagos érző neuronokra való áttevődését.

Kimutattuk, hogy a gerincvelő felületes hátsó szarvi axonterminalisok nem expresszálják a KCC2 klorid transzportert, ami valószínűvé teszi, hogy a gerincvelő felületes hátsó szarvában levő axo-axonikus szinaptikus kapcsolatokban levő GABA_A receptorok aktiválása nem hiperpolarizációt, hanem depolarizációt vált ki a posztzinaptikus axonterminalisban.

Vizsgáltuk a feszültség függő nátrium ioncsatornák szerepét a nociceptív primer afferensekről a másodlagos érző neuronokra való ingerület áttevődésben. Azt találtuk, hogy az általános nátrium ioncsatorna blokkoló lamotrigin hatására lényegesen csökken a szinaptikus transzmisszió hatékonysága.

A Ryuichi Shigemoto által vezetett kutatócsoporttal (National Institutes of Physiological Sciences, Okazaki, Japan) való kollaborációban, a közelmúltban kidolgozott „sodium dodecil sulphate-digested freeze-fracture replica labeling” (SDS-FRL) módszert használva vizsgáltuk a gerincvelő felületes hátsó szarvában az NMDA és AMPA receptorok számát, denzitását és ko-lokalizációját egyedi szinaptikus kapcsolatok szintjén a posztzinaptikus membránban. Azt találtuk, hogy valamennyi glutamaterg szinapszis posztzinaptikus membránja expresszál AMPA receptort a gerincvelő hátsó szarvában, és többségük (96%) az NMDA receptor NR1 alegységére is pozitív immunreakciót adott. Az AMPA és NMDA receptorokat jelölő arany szemcsék száma 8-214 és 5-232 között változott és pozitív korrelációt mutatott az egyedi posztzinaptikus membránok nagyságával. Az aranyrögök denzitása ugyanakkor AMPA receptorok esetén 325-3365/μm², NMDA receptorok esetén 84-2263/μm² értékek között változott. Szinte valamennyi (99%) posztzinaptikus membrán expresszálta az AMPA receptorok GluR2 alegységét, és többségük (90%) immunreaktív volt a GluR1 alegységre is. A GluR2 alegységeket jelölő arany szemcsék száma lineáris korrelációt mutatott a posztzinaptikus membrán nagyságával. A GluR1-et illetően azonban a szinapszisoknak két csoportja létezhet, az egyik alacsony a másik magas GluR1 denzitással.

A nociceptív ingerület feldolgozásban jelentős szerepet játszó gerincvelő hátsó szarvi neuronok fiziológiai tulajdonságai

Túlélő gerincvelő szelet preparátumon patch-clamp módszer segítségével vizsgáltuk az idegsejtek ingerelhetőségét alapvetően meghatározó ion áramokat a gerincvelő felületes hátsó szarvának tónusosan tüzelő neuronjaiban. Úgy találtuk, hogy az apamin-szenzitív Ca²⁺-dependens K⁺ (K_{CA}) áramok megnyújtják az interspike intervallumokat és stabilizálják a fenntartott membrán depolarizáció által kiváltott tüzelést. A Ca²⁺ és K_{CA} áramok szupressziója

azonban a tónusos tüzelést nem szünteti meg, azt sugallva, hogy a tónusos tüzelési mintázatok kialakításáért elsődlegesen feszültség-függő Na^+ és K^+ áramok felelősek. Ezért a Na^+ és K^+ áramokat további vizsgálatoknak vetettük alá. A Na^+ csatornák gyors aktivációs és inaktivációs kinetikát mutattak. A K^+ áramokért elsődlegesen TEA-szenzitív gyorsan aktiválódó, lassan inaktiválódó és elhúzódó rektifikációt mutató ún. K_{DR} csatornák tehetők felelőssé. A TEA inszenzitív tranziens A-típusú K^+ (K_{A}) áram nagyon kicsi volt és már nyugalmi potenciálon erőteljesen inaktiválódott. A K_{DR} áramok TEA-val való blokkolása csökkentette a tüzelés frekvenciáját és stabilitását. Az adataink alapján végül elkészítettük a tónusosan tüzelő neuronok matematikai modelljét, aminek a segítségével kimutattuk, hogy a Na^+ és K_{DR} áramok elegendőek a tónusos tüzelési mintázat kialakításához. A többi ionáram a tónusos tüzelési mintázat modulációjában játszhat szerepet.

Gerincvelő hátsó szarvi propriospinalis neuronok megoszlása, szinaptikus kapcsolatai és neurokémiai tulajdonságai

Korábbi kísérleteinkben igazoltuk, hogy a gerincvelői hátsó szarv kétoldali lateralis területei erőteljes morfológiai és funkcionális commissuralis kapcsolatot alakítanak ki egymással. Neuronális jelölési technikák és immunhisztokémiai módszerek kombinációjával jelenlegi kísérleteinkkel ezeknek a commissuralis neuronoknak és axon terminalisaiknak az eloszlását, szinaptikus kapcsolatait és neurokémiai jellegzetességeit vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy a commissuralis neuronok sejtestjei kizárólag a III-IV lamina leglateralisabb területein helyezkednek el, és axonjaik az ellentétes oldali hátsó szarv ugyanezen területein érnek véget. A legtöbb commissuralis axonterminalis dendritekkel alkotott szinaptikus kapcsolatot. Azt is kimutattuk, hogy a commissuralis neuronok egymással is szinaptikus kapcsolatba lépnek. Az axon terminálisok több mint három-negyede immunreaktívnak bizonyult glutaminsav decerboxilazra és/vagy glicin transzporterre, de valamennyien negatívak voltak met-enkephalinra és valamennyi ismert vesicularis glutamát transzporterre. Az eredményeink azt sugallják, hogy a gerincvelői hátsó szarv két oldala között létezik egy erőteljes commissuralis összeköttetés és a commissuralis neuronok nagyobb részben gátló, kisebb részben serkentő ingerületeket közvetíthetnek a gerincvelő ellenkező oldala felé.

Kísérleteinkben azt is kimutattuk, hogy a gerincvelő felületes hátsó szarvának medialis részben számos olyan propriospinalis neuron található, amely a felületes hátsó szarv lateralis területeihez vetít. Ezt a medi-lateralis propriospinalis projekciós rendszert vizsgálva a gerincvelő hátsó szarvának medialis részébe Phaseolus vulgaris leucoagglutinint injektáltunk és így jelöltük az injekciós területen elhelyezkedő neuronok axonjait. Az axonális jelölést

GABA és glicin immunhisztokémiai kimutatásával kombinálva vizsgáltuk a jelölődő axonterminálisok és posztszinaptikus targetjeik neurokémiai jellegzetességeit. A PHA-L injekciót követően nagy számban találtunk jelölt axonterminálisokat a hátsó szarvi szürkeállomány laterális részének II-IV laminájában. A jelölt axonterminálisok nagy többsége dendritekkel és dendrit tövisekkel képzett szimmetrikus szinaptikus kapcsolatokat. Ezen túl a jelölődött axon terminálisok egy része szinaptikus kapcsolatokat fogadott ismeretlen eredetű preszinaptikus axonoktól. A PHA-L jelölést kombinálva VGLUT1-2, GAD 65/67 és GLYT2 immunfestéssel kimutattuk, hogy a projekciós axonoknak kb. egy-harmada tekinthető gátlónak és kétharmaduk serkentőnek. Az axonális jelölődés helyére, a laterális hátsó szarv I-IV-es laminájába rhodaminnal konjugált dextránamint injektálva jelöltük az ide vetítő propriospinalis axonok eredő sejtjeit. Az injekciót követően számos neuron jelölődött retrograd módon a medialis hátsószarv I-II. laminájában, és a jelölődött sejtek többsége számos kontaktust létesített CGRP-pozitív és IB4-kötődést mutató nociceptív primer afferensekkel. Eredményeink azt mutatják, hogy a gerincvelői felületes hátsó szarv nociceptív recipiens sejtjeinek egy része erőteljesen vetít a laterális hátsó szarv II-IV laminájához, ahol elsődlegesen serkentő, kisebb részben gátló jellegű szinaptikus kapcsolatokat létesítenek a terület lokális interneuronjainak dendritjeivel.

A gerincvelő hátsó szarvi neuron hálózatok plaszticitása gyulladással járó fájdalom modellben

Vizsgáltuk, hogy a talp bőrében kísérletesen kiváltott gyulladás a gerincvelői hátsó szarv felületes lamináiban milyen változásokat okoz az AMPA receptorok alegység összetételében illetve a GABA_B-receptor expressziójában. A gyulladással járó állapotot Freund adjuvánsnak a talp bőrébe történő injekciójával váltottuk ki. Az injekció utáni negyedik napon, amikor az állatok nociceptív válaszkészsége erőteljesen megnőtt, azt találtuk, hogy a hátsó szarv I-II laminájában a GluR1-IR sejtek száma 31 %-kal nőtt, míg a GluR2-IR sejtek száma 34 %-kal csökkent, a GluR1-re és GluR2-re kettősen jelölt sejtek száma pedig az eredeti érték 15 %-ára csökkent. Úgy találtuk, hogy kontroll állatokban a calbindin-IR excitatorikus neuronok elsősorban GluR2 alegységet expresszálnak. Freund adjuváns talpba történő injektálását követően a calbindint tartalmazó neuronok között csökkent a GluR2-IR és növekedett a GluR1-IR sejtek száma. Más volt a helyzet a gátló neuronok esetében. GAD65-eGFP transzgenikus kontroll állatokban a GAD65-eGFP pozitív gátló sejtek többsége GluR1 immunreaktivitást mutatott. Freund adjuváns talpba történő injektálását követően a GFP-t expresszáló gátló sejtek között jelentősen csökkent a GluR1-IR és nőtt a GluR2-IR sejtek száma. A GluR1 és GluR2 alegységek expressziójában a perifériás gyulladás következtében

kialakuló változások jelentős mértékben hozzájárulhatnak a gerincvelői centrális szenzitizáció kialakulásához.

Az injekció utáni negyedik napon erőteljesen csökkent a gerincvelői hátsó szarv GABAB receptor immunreaktivitása is. A nociceptív primer afferensek axonterminalisainak a száma nem változott, de jelentősen csökkent közöttük a GABAB receptor immunreaktivitást mutatók száma. A GABAB receptor mennyiségének a primer afferensek axon terminálisain való csökkenése a nociceptív afferensek és a gerincvelői interneuronok közötti szinaptikus kapcsolatok preszinaptikus gátlásának gyengüléséhez vezethet. Ez a gerincvelői neuronok által fogadott nociceptív bemenetek erősödését eredményezheti, ami hozzájárulhat a centrális szenzitizáció kialakulásához.

A primer afferensek projekciója premotor interneuronokhoz

Retrograd és anterograd neuronális jelölési módszerek kombinálásával egyidejűleg jelöltünk premotor interneuronokat és elsődleges érző rostokat a gerincvelő lumbalis szakaszának szürkeállományában. Kimutattuk, hogy a premotor interneuronok egy része közvetlen kapcsolatokat létesít primer afferensekkel. A kontaktusok kvantitatív elemzése azonban azt mutatta, hogy ezeknek a kapcsolatoknak a száma meglehetősen alacsony. Eredményeinket összevetve korábbi irodalmi adatokkal arra a következtetésre jutottunk, hogy a primer afferensek a premotor interneuronokkal bár korlátozott számú, de nagyon hatékonyan működő szinaptikus kapcsolatokat alakítanak ki. A primer afferens ingerületek valószínűleg néhány szinaptikus kapcsolat aktiválásának a révén is tüzelésre tudják készíteni a premotor interneuronokat.

A motoros működéseket szabályozó preszinaptikus gátlási folyamatok a gerincvelő mellső szarvában

Az izomorsó (Ia) afferensek terminálisai és a gerincvelői motoneuronok közötti monoszinaptikus kapcsolatok axo-axonikus preszinaptikus gátlása fontos szerepet játszik a gerincvelői motoros működések szabályozásában. Munkánk során kimutattuk, hogy az Ia afferens-motoneuron szinaptikus kapcsolat preszinaptikus gátlásáért felelős axon terminalisok eredő sejtjei a gerincvelői szürkeállomány V-VI laminájának medialis részében helyezkednek el. Kimutattuk azt is, hogy a gerincvelői mellső szarv többi gátló sejtjével ellentétben ezek a neuronok a GABA szintéziséhez a GAD 65 kD-os izoformáját használják.

A gerincvelő két oldalának motoros működéseit összehangoló commissuralis premotor interneuronok neurokémiai karakterizálása

A járómozgás során a jobb és bal oldali gerincvelő-fél motoros működéseinek pontos összehangolására van szükség. Ezt a koordinációt un. commissuralis premotor interneuronok végzik. Vizsgáltuk azt, hogy a commissuralis interneuronok ezt a koordinációt serkentő, vagy gátló kapcsolatok révén biztosítják –e, illetve az esetleges gátló komponenseket GABA vagy glicin mediálja -e. A commissuralis interneuronok sejttestjei területére BDA-t injektáltunk, ami jelölte a commissuralis axonokat és azok terminálisait. Ezt követően a BDA-val jelölt axon terminálisoknak vizsgáltuk a VGLUT1/2, GAD65/67 és GLYT2 immunreaktivitását. Több mint 1000 terminálist elemezve a terminálisok több mint fele bizonyult GAD65/67 és/vagy GLYT2 immunreaktívnek, míg a terminálisok több mint egy-harmada mutatott pozitív immunfestődést VGLUT1/2-re. Eredményeink azt mutatják, hogy a commissuralis interneuronok neurokémiai jellegüket illetően nagyon heterogének, többségük gátló és a gátló jellegűek több mint kétharmada glicint szabadít fel neurotranszmitterként.

A gerincvelői neuronhálózatok fejlődése során lezajló természetes sejtelhalási folyamatok

Korábbi irodalmi adatokkal ellentétben, az apoptotikus sejtelhalás egyik legszenzitívebb markerének, az aktivált caspase-3-nak immunhisztokémiai módszerekkel történő kimutatásával igazoltuk, hogy a neurogenesis során nagy számban halnak el interneuronok a gerincvelői szürkeállomány mellső és hátsó szarvában egyaránt. Elsőként leírtuk, hogy csirkében a gerincvelői interneuronok elhalása a nyolcadik embrionális napon kezdődik és a huszadik embrionális napra fejeződik be.