A kokain- és amfetamin-regulált transzkript (CART) peptid a gerincvelői szintű nociceptív információfeldolgozásban szerepet játszó neuronális hálózatokban

Doktori értekezés

Szeretettel ajánlom fiamnak, Áronnak.

dr. Kozsurek Márk

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola

Témavezetők:	Dr. Puskár Zita, Ph.D.
	Dr. Gerber Gábor, Ph.D.
Hivatalos bírálók:	Dr. Fürst Zsuzsanna, D.Sc.
	Dr. Jancsó Gábor, D.Sc.
Szigorlati bizottság elnöke:	Dr. Nagy M. György, D.Sc.
Szigorlati bizottság tagjai:	Dr. Lendvai Balázs, Ph.D.
	Dr. Arányi Zsuzsanna, Ph.D.

Budapest
2009

Tartalomjegyzék

1. Rövidítésjegyzék 3
2. Bevezetés 4
2.1. A szenzoros és nociceptív információfeldolgozás anatómiai alapjai 4
2.2. Kokain- és amfetamin-regulált transzkript: a géntől a peptidekig 18
2.3. A CART peptidek által szabályozott élettani folyamatok 25
2.4. A CART nocicepcióban betöltött szerepére utaló irodalmi adatok 28
3. Célkitűzések 32
4. Módszerek 33
5. Eredmények 41
5.1. A CART peptid gerincvelői megoszlása patkányban 41
5.2. A CART peptid kolokalizációja primer afferens, interneuron és leszálló pálya markerekkel 42
5.3. A CART peptid előfordulási gyakorisága a primer afferensekben. A CART és a galanin kolokalizációja a lamina I-ben 45
5.4. Elektronmikroszkópos vizsgálatok 48
5.5. CART peptid tartalmú végződések a lamina I projekciós neuronjain 49
6. Megbeszélés 54
7. Következtetések 64
8. Összefoglalás 65
9. Summary 67
10. Irodalomjegyzék 69
11. Saját publikációk jegyzéke 100
12. Köszönetnyilvánítás 103

1. Rövidítésjegyzék

5-HTT: szerotonin transzporter

ACTH: adrenocorticotrop hormon

AMPA: α-amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionát

CART: kokain- és amfetamin-regulált transzkript (cocaine- and amphetamine-regulated transcript), ill. az mRNS által kódolt fehérjetermék

CGRP: kalcitonin gén-rokon peptid (calcitonin gene-related peptide)

CRH: corticortop releasing hormon

CTb: kolera toxin β-alegység

DβH: dopamin-β-hidroxiláz

GLYT2: glicin transzporter 2

GAL: galanin

GnRH: gonadotropin releasing hormon

IB4: *Bandeireae simplicifolia* izolektin B4

LPb: lateralis parabrachialis area

LTP: hosszú távú potencírozás (long term potentiation)

NMDA: N-metil-D-aszparaginát

NK1R: neurokinin 1-receptor

NT: neurotenzin

PB: foszfát-puffer (phosphate buffer)

PBS: foszfát-pufferelt fiziológiás sóoldat (phosphate buffered saline)

SOM: szomatosztatin

SP: P-anyag (substance P)

TRH: thyreotropin releasing hormon

TSH: thyroidea stimuláló hormon

T_3/T_4: trijód-tironin, tiroxin

VGAT: vezikuláris GABA transzporter

VGLUT2: vezikuláris glutamát transzporter 2

„Ha elvennék tőlünk mindazt, ami fájdalmat okoz, mi maradna?”

Henri Barbusse

2. Bevezetés

A fájdalom nem csupán kellemetlen érzés, hanem nagyon fontos figyelmeztető jel is, mely védi az élő szervezetet a súlyosabb károsodástól vagy akár a pusztulástól. A tartósan fennálló fájdalom viszont – eredeti célján túllépve – súlyosan korlátozhatja az egyén megszokott életvitelét, sőt, az egész személyiséget maga alá gyűrheti és gúzsba kötheti. Nem meglepő tehát, hogy mióta az ember a fájdalmat ismeri, azóta harcol is ellene. A fájdalom hatékony és korszerű csillapítása azonban csak úgy képzelhető el, ha egyre jobban megismerjük azokat a rendszereket – gerincvelői és agyi neuronhálózatokat, idegpályákat, neurotranszmittereket és neuromodulátorokat –, melyek a fájdalom kialakulásáért és sokszor krónikussá válásáért felelősek.

2.1. A szenzoros és nociceptív információfeldolgozás anatómiai alapjai

A fájdalomérzést illetően kétféle szemlélet terjedt el. A *konvergencia elmélet* szerint (Price és Dubner, 1977; Price, 1988; Wall, 1973; Willis, 1985; Willis és Westlund, 1997) a szomatoszenzoros aktivitás sajátos mintázata, a bizonyos neuronokon konvergáló különböző modalitású és intenzitású szenzoros információk eredője határozza meg, hogy valamely érzést fájdalomként élünk-e meg. A *specificitás elmélet* értelmében a fájdalmat, ill. annak különféle modalitásait eleve erre a célra „szánt”, specifikus perifériás (receptorok, perifériás idegek) és centrális struktúrák (neuronok, pályák, magok és kérgi mezők) továbbítják és dolgozzák fel (Craig, 2003a; 2003b; Perl, 1971).

A szenzoros információ útját végigkövetve a perifériás receptortól egészen az agykéregig mind a specificitás, mind a konvergencia megnyilvánulására találunk példát. Éppen ezért a két elméletet nem egymással szemben álló, hanem egymást kiegészítő megközelítési módként célszerű kezelni (*inegtratív fájdalom szemlélet*). Legújabban – különösen főemlősökben és az emberben – a fájdalmat *homeosztatikus érzésnek*

(*„homeostatic emotion”*) tekintik: a fájdalom egy a szervezetet érő olyan inger, mely a szervezet homeosztázisát felborítja. A túléléshez az egyensúly helyreállítása szükséges, melyet komplex affektív, vegetatív és neuroendokrin működések, valamint viselkedési minták biztosítanak (Craig, 2003b).

2.1.1. A szenzoros információ útja a receptoroktól a gerincvelőig

Az érzőreceptorok közül elsőként a mechanoreceptorokat (Meissner-, Vater-Pacini-, Meckel-, Ruffini-féle tapintótestek, Golgi-féle ínorsó, izomorsó) írták le. Ezek vékony (Aδ vagy III. típusú), közepes (Aβ vagy II. típusú), ill. vastag velőhüvelyes (Ia és Ib típusú) szenzoros idegrostvégződések és más szöveti komponensek (módosult Schwann-sejtek, izomszövet, ínszövet, stb.) által együttesen létrehozott komplex struktúrák (Barr és Kiernan, 1988; Cajal, 1952), melyek meghatározó szerepet játszanak a finom, diszkriminatív tapintás, a vibráció (epikritikus szenzibilitás), valamint az izmok, inak és izületi tokok, szalagok megnyúlásának érzékelésében (propriocepció).

A sajátos szerkezetű mechanoreceptorok mellett ismertek az ún. „szabad idegvégződések”, melyek a vékony myelinhüvelyes (Aδ vagy III. típusú), ill. a velőshüvely nélküli (C vagy IV. típusú) rostok perifériás végződései. Ez utóbbi receptorok elsősorban a hő- és fájdalomérzékelésben játszanak meghatározó szerepet (Barr és Kiernan, 1988).

A nociceptor kifejezést Sherrington vezette be: olyan receptort értünk alatta, mely a szöveteket potenciálisan vagy ténylegesen károsító külső-belső hatásokat érzékeli (Sherrington, 1906). A nociceptorok egy része szelektív a fájdalom valamely modalitására nézve, így elkülönítünk például mechanikus nociceptorokat, vagy olyanokat, melyek csak a fájdalmas hőingerekre reagálnak. Más nociceptorok nem specifikusak: kellő intenzitású mechanikus, kémiai vagy hőhatás (hideg vagy meleg) egyaránt aktiválja őket (Bessou és Perl, 1969; Torebjork, 1974). A nociceptorok specificitásának és szelektivitásának hátterében különböző, transzducerként működő membránreceptorok és ioncsatornák állnak. A bőr nociceptorainak jórésze TRPV1-(tranziens receptor potenciál vanilloid) receptort tartalmaz. Ezek a receptorok olyan transzducerek, melyek fájdalmas hőingerre, alacsony pH-ra és néhány kémiai anyagra – kapszaicin, reziniferotoxin – reagálnak. Más bőrreceptorok a TRPV2-receptort exprimálják, mely csak kifejezetten fájdalmas hőt érzékel (Caterina és mtsai, 1999;

Caterina és Julius, 2001). A nociceptorokon léteznek még ún. ASIC- (savérzékeny ioncsatorna; acid sensing ion channel) receptorok, melyeket az alacsony pH aktivál (Habelt és mtsai, 2000; Immke és McCleskey, 2001; Sutherland és mtsai, 2001). Végül megemlítjük az ENaC-ot (epithelialis Na^+-csatorna; epithelial sodium channel), mely az erős mechanikai stimulusok érzékelésében jut szerephez (Garcia-Anoveros és mtsai, 2001; Price és mtsai, 2000).

A nociceptorok többsége vékony velőhüvelyes Aδ vagy myelinhüvely nélküli C roston keresztül továbbítja az ingerületet a központi idegrendszer felé (Willis és Coggeshall, 2004). Az érző idegrostok vezetési sebessége és a myelinhüvely vastagsága között szoros összefüggés van. A bőrt beidegző vastag myelinhüvelyes Aβ rostok, a vékony velőhüvelyes Aδ rostok és a myelinhüvellyel nem rendelkező C rostok vezetési sebessége rendre 30-100 m/s (Erlanger és Gasser, 1937), 4-30 m/s (Boivie és Perl, 1975), ill. 0,5-2,5 m/s (Gasser, 1950), vagyis az Aβ rostokon az ingerület sokkal hamarabb érkezik meg a központi idegrendszerbe, mint az Aδ vagy C rostok esetén. A velőshüvely vastagsága és az idegrost ingerküszöbe között fordított arányosság áll fenn: a legkisebb ingerküszöbbel az Aβ, a legmagasabbal pedig a C rostok rendelkeznek.

A spinalis ganglionokban elhelyezkedő pseudounipolaris sejtek mintegy hidat képeznek a perifférián elhelyezkedő receptor és a szenzoros információtovábbítás és -feldolgozás következő szintjét képező gerincvelő között. A ganglion spinale idegsejtjeit – a többféle lehetséges, de leginkább elterjedt klasszifikáció szerint – kis és nagy neuronokra tagoljuk. Az esetek többségében korrelál a sejttest mérete a perifériás és a centrális nyúlvány myelinizáltságának mértékével: a nagy sejtekhez többnyire az izom- és ínorsók felől, valamint a bőr mechanoreceptoraiból érkező vastag velőhüvelyes rostok tartoznak, míg a kisméretű sejtek főleg a nocicepcióban érintett vékony myelinhüvelyes vagy myelinhüvely nélküli rostokkal rendelkeznek (Willis és Coggeshall, 2004).

A kis sejtek egy csoportja valamilyen neuropeptidet, sőt többnyire neuropeptideket exprimál: leggyakrabban a kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP, calcitonin gene-related peptide), P-anyag (SP, substance P), szomatosztatin (SOM), galanin (GAL), kolecisztokinin, bombezin, vazoaktív intesztinális polipeptid, enkefalin, endorfin, vazopresszin, oxitocin, dinorfin fordul elő bennük (Willis és Coggeshall, 2004). Ezek a petidek nem csupán a sejttestben vannak jelen: axonalis transzporttal

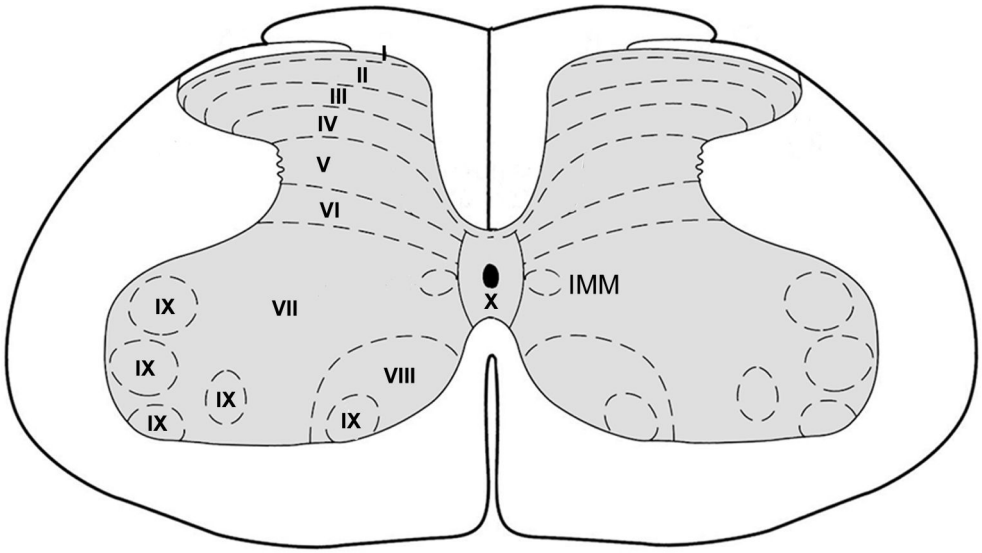
eljutnak a gerincvelő hátsó szarvában végződő centrális terminálisokba is (Zhang és mtsai, 1993).

A különböző modalitású receptorokból ingerületet szállító, különböző vastagságú, ingerküszöbű, vezetési sebességű és végződési területű rostok neurokémiai szempontból is heterogének. Neurokémiai markerek segítségével a primer afferensek különböző alcsoportjai különíthetők el. A C rostok mintegy fele CGRP-t, ill. ezzel együtt sokszor más peptideket is exprimál (peptiderg primer afferensek) (Hunt és mtsai, 1992; Lawson, 1992). A C rostok másik fele nem tartalmaz peptidet, viszont nagy affinitással köti a *Bandeiraea simplicifolia* B4 izolektint (IB4). A CGRP és az IB4 együttesen gyakorlatilag a teljes C rostpopulációt lefedi, bár a két marker között mintegy 7-10%-os átfedés van (Alvarez és mtsai, 1991; Silverman és Kruger, 1990). A velőhüvelyes rostok jelölésére nincs intrinzik marker, de felveszik és a gerincvelő irányába szállítják a perifériás idegbe injektált kolera toxin β-alegységet (CTb) (Robertson és Grant, 1985), mely immunreakcióval láthatóvá tehető.

A primer afferensek elsődleges neurotranszmittere a glutamát, de a peptiderg rostok esetében az ingerületátvitelt számos más, a ganglion spinale sejtjeinél már említett neuropeptid is modulálhatja. A tucatnál is több fehérje közül ki kell emeljük a CGRP-t, a SP-t és a galanint. Tekintettel arra, hogy a CGRP a gerincvelő hátsó szarvában kizárólag a primer afferensekben fordul elő (Carlton és mtsai, 1987; Ju és mtsai, 1987), gyakorlatilag a peptiderg primer afferensek specifikus markerének tekinthető. A SP-t pedig elsődleges „fájdalom-transzmitterként” is szokás emlegetni: fiziológiai vizsgálatok szerint a SP csak azon primer afferensekben van jelen, melyek nociceptív információt szállítanak, és a peptid csak intenzív perifériás stimulusok határsára szabadul fel az afferens végződésekből (De Koninck és Henry, 1991; Lawson és mtsai, 1997; Marvizon és mtsai, 1997). A primer afferensekben előforduló fehérjék közül az egyik legtöbbet tanulmányozott neuropeptid a galanin, melynek kiemelt jelentőséget tulajdonítanak a spinalis szintű nociceptív információfeldolgozásban és a krónikus fájdalomszindrómák kialakulásában, fenntartásában. Jelentőségét alátámasztja, hogy a CGRP-t és SP-t tartalmazó primer afferensek mintegy felében megtalálható (Tuchscherer és Seybold, 1989; Zhang és mtsai, 1993; Zhang és mtsai, 1995a).

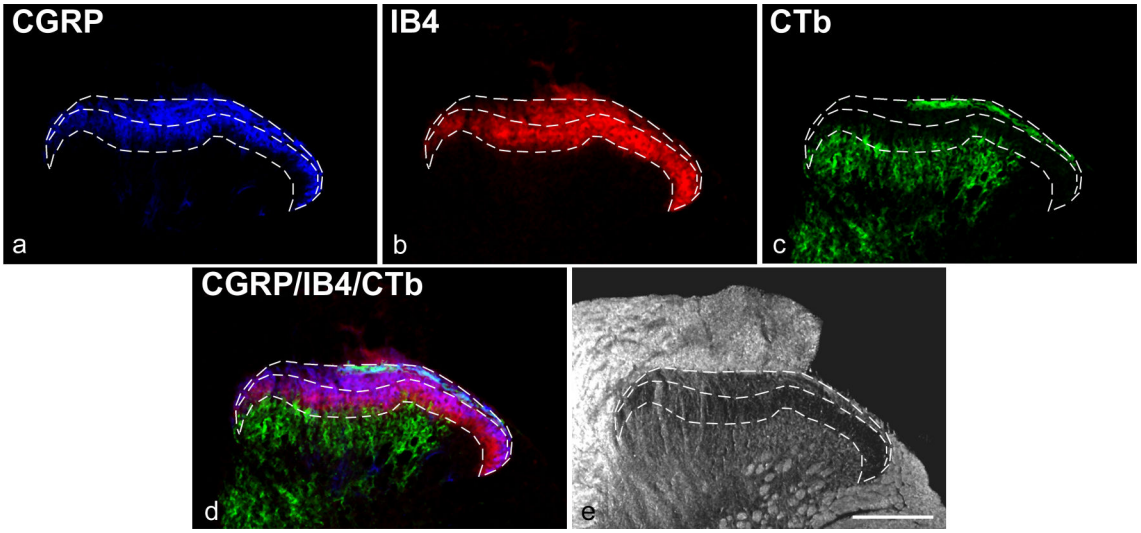
2.1.2. A gerincvelő hátsó szarvának neuronalis szerveződése

A gerincvelő szürkeállományát Rexed a sejtes szerveződésben mutatkozó különbségekre alapozva egymást különösen a hátsó szarvban rétegesen követő területekre, laminákra tagolta (Rexed, 1952). A Rexed-féle laminák tehát nem funkcionális, hanem sokkal inkább morfológiai egységekként születtek meg (1. ábra), s a morfológia és a funkció közötti kapcsolat csak később kezdett körvonalazódni.



1. ábra. A patkány gerincvelő L4 szegmentuma. A hátsó szarv felületes (lamina I-II) és mély (lamina III-IV) laminákra tagolható. A felületes laminák a nociceptív információfeldolgozás kiemelten fontos területei (Paxinos és Watson, 1998, The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 4. kiadás alapján).

A spinalis ganglionokban elhelyezkedő kis és nagy sejtek centrális nyúlványai a hátsó gyökereken keresztül lépnek be a gerincvelőbe, és a szürkeállományban jellegzetes megoszlást mutatva – különböző rosttípusok más-más laminákat preferálva – végződnek (2. ábra). Az Aδ és C rostok a Lissauer-féle széli zónán keresztül haladva a hátsó szarvba annak lateralis oldala felől lépnek be. A C rostvégződések csak a felületes laminákban, azon belül is a lamina I-ben és a lamina II külső részében (II_o, „outer”) vannak jelen. Az Aδ rostok a lamina I területén, majd a lamina II-t kihagyva a lamina II-III határán fordulnak elő nagyobb mennyiségben, de néhány rost a mélyebb laminákat is eléri (Light és Perl, 1979; Sugiura és mtsai, 1986). Az Aβ rostok a hátsó szarv medialis oldalán haladnak ventral felé, s végződnek a mély laminákban és az intermedier szürkeállományban (lamina III-VI) (LaMotte és mtsai, 1991; Millan, 1999; Rivero-Melian és Grant, 1991; Woolf és mtsai, 1995).



2. ábra. Primer afferensek végződési mintázata a patkány gerincvelő hátsó szarvában. A velőshüvely nélküli C rostok két alcsoportja: a) a CGRP-t exprimáló peptiderg rostok, és b) az IB4-et kötő nem peptiderg axonok. c) A CTb a velőshüvelyes rostok (Aδ és Aβ) végződési területét teszi láthatóvá. d) A CGRP és CTb immunreakciók, valamint az IB4 kötődés (a-c) összevetített képe. e) A felületes laminák határai a transzmissziós kép segítségével határozhatók meg, a lamina II mint a hátsó szarv áttetsző sávja ábrázolódik (Kozsurek és Puskár anyagából). Mérték: 250 µm.

A fájdalmas ingerek feldolgozását illetően kiemelt jelentőségűek a felületes laminák (lamina I-II): itt végződik a többnyire nociceptív információt szállító Aδ és C rostok túlnyomó többsége, és a lamina I-ből indulnak a fájdalmas stimulusokat a magasabb agyi központok – substantia grisea centralis, lateralis parabrachialis area (LPb), caudalis ventrolateralis medulla, nucleus tractus solitarii és a thalamus – irányába továbbító rostok (Willis és Coggeshall, 2004).

A lamina I idegsejtjei – interneuronok és projekciós sejtek egyaránt – szómájuk alakja és dendritjeik horizontális síkban mutatott elágazódási mintázata alapján lehetnek fuziformak, piramis alakú és multipolárisak (Almarestani és mtsai, 2007; Gobel, 1978; Lima és Coimbra, 1986; Lima és mtsai, 1991; Spike és mtsai, 2003; Yu és mtsai, 1999; Zhang és mtsai, 1996; Zhang és Craig, 1997), *in vivo* kísérletekben a különböző stimulusokra adott válaszok alapján nociceptív-specifikusak, polimodális nociceptívek (fájdalmas hidegre, melegre és nyomásra egyaránt érzékenyek) és nem-fájdalmas hőingerre reagálók (Craig és Kniffki, 1985; Dostrovsky és Craig, 1996; Han és mtsai, 1998). A lamina I sejtek morfológiai és fiziológiai tulajdonságai között bizonyos mértékű korrelációt írtak le macskákban. A fuziform sejteket nociceptív-specifikusnak találták: a piramis alakú neuronok csak nem-fájdalmas hidegingerre

reagálnak, míg a multipoláris sejtek vagy fájdalom-specifikusak vagy polimodálisak (hidegre, melegre és nyomásra egyaránt érzékenyek)(Han és mtsai, 1998). *In vitro* körülmények között, a depolarizáció során észlelt tüzelési mintázatuk alapján a lamina I projekciós neuronok lehetnek ún. *gap firing* vagy *bursting firing* típusúak (Ruscheweyh és mtsai, 2004), így sajátos tüzelési mintázatuk alapján jól elkülöníthetőek az interneuronoktól.

Neurokémiai szempontból fontos a neurokinin 1-receptort (NK1R) exprimáló, ill. nem-exprimáló lamina I projekciós neuronok elkülönítése. A receptor, melyen keresztül a SP hat, a lamina I projekciós sejtek mintegy 80%-ának felszínén megtalálható (Brown és mtsai, 1995; Littlewood és mtsai, 1995; Liu és mtsai, 1994; Marshall és mtsai, 1996; Todd és mtsai, 2000; Yu és mtsai, 1999). Számos érv szól amellett, hogy az NK1R-pozitív sejtek fájdalomingerekre válaszolnak. Akut nociceptív ingert követően a lamina I sejtjeinek többsége internalizálja a felszínén lévő NK1R-okat (Mantyh és mtsai, 1995), ill. a sejtekben c-Fos jelenik meg (Doyle és Hunt, 1999). További bizonyíték a SP és az NK1R nocicepcióban betöltött szerepe mellett, hogy a kísérletes hyperalgesia drasztikus csökkenését észlelték, mikor SP-hez konjugált citotoxikus saporinnal szelektíven kiírtották a lamina I NK1R-pozitív sejtjeit (Mantyh és mtsai, 1997). A felületes laminákban elhelyezkedő NK1R-pozitív neuronok nélkülözhetetlenek a centrális szenzitizáció szempontjából: ez a mechanizmus a krónikus fájdalom szindrómák egy részében a tünetek tartós fennmaradását magyarázhatja (Khasabov és mtsai, 2002; Mantyh és mtsai, 1997; Mantyh és Hunt, 2004; Nichols és mtsai, 1999).

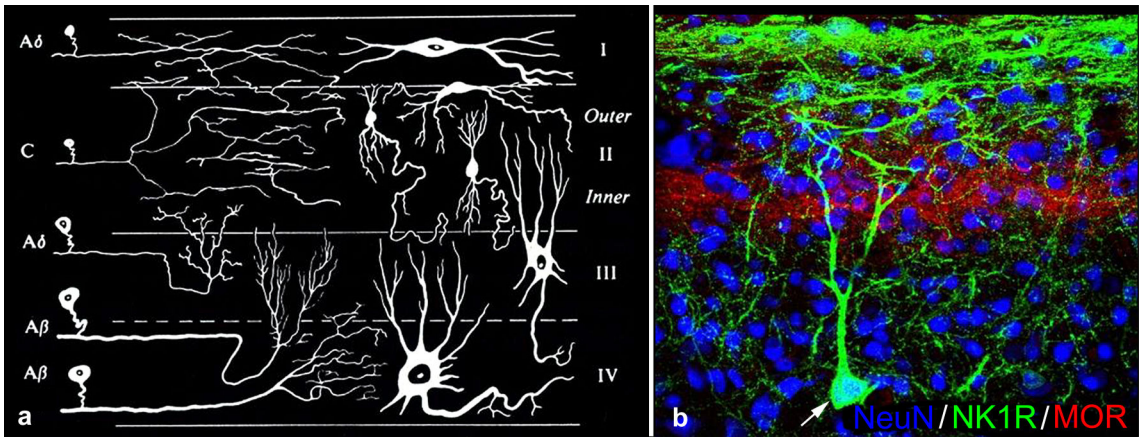
A gerincvelőben történő információfeldolgozás komplexitását önnmagában is sugallja az a tény, hogy a hátsó szarv idegsejtjeinek túlnyomó többsége egymással lokális kapcsolatot kialakító, ill. interszegmentális interneuron (Polgar és mtsai, 2004; Spike és mtsai, 2003; Willis és Coggeshall, 2004), és az általuk feldolgozott nociceptív információt csak viszonylag kisszámú projekciós neuron (a lamina I sejtek körülbelül 5%-ka) továbbítja a supraspinalis központokba (Craig, 1995; Gauriau és Bernard, 2002; Lima és Coimbra, 1988; Menetrey és mtsai, 1982; Spike és mtsai, 2003; Trevino és Carstens, 1975).

A lamina II interneuronjait morfológiai megjelenésük alapján négy fő csoportba soroljuk, elkülönítve a szigetsejteket (islet cells), a vertikális (stalked),

centrális és radiális sejteket (Grudt és Perl, 2002; Heinke és mtsai, 2004; Willis és Coggeshall, 2004). A felületes laminák interneuronjai tüzelési mintázatuk alapján ugyancsak négyfélék lehetnek: beszélünk *tonic firing*, *initial bursting*, *delayed firing* és *single spiking* típusokról (Grudt és Perl, 2002; Lopez-Garcia és King, 1994; Ruscheweyh és Sandkuhler, 2002; Thomson és mtsai, 1989).

A hátsó szarv excitatoros interneuronjainak elsődleges neurotranszmittere a glutamát, s többségük exprimálja a VGLUT2 vezikuláris glutamát transzporter 2-t. A glutamáton túl ezek a sejtek többek között szomatosztatint, neurotenzint, SP-t, kalbindint, kalretinint tartalmazhatnak (Antal és mtsai, 1991; Proudlock és mtsai, 1993; Todd és mtsai, 1992a; Todd és Spike, 1993; Todd és mtsai, 1994; Todd és mtsai, 2003). Az inhibitoros interneuronok (a lamina I-III interneuronjainak kb. 30%-a) GABA és/vagy glicinergek, s exprimálják a VGAT vezikuláris GABA transzportert, ill. a GLYT2 glicin transzporter 2 fehérjét. A GABA-erg, de nem glicinerg gátló interneuronokban neuropeptid Y-t, enkephalint, acetilkolint, galanint, ill. nitrogén-monoxid szintetázt mutattak ki, míg azokban a sejtekben, ahol GABA és glicin együtt fordul elő parvalbumint és nitrogén-monoxid szintetázt írtak le.(Laing és mtsai, 1994; Polgar és mtsai, 2003; Rowan és mtsai, 1993; Simmons és mtsai, 1995; Todd és Sullivan, 1990; Todd, 1991; Todd és mtsai, 1992b; Todd és Spike, 1993). Ma még nem tisztázott, hogy a lamina I-II interneuronok különböző morfológiai, fiziológiai és neurokémai szempontok szerint kialakított csoportjai miként feleltethetők meg egymásnak, ill. hogy ilyen jellegű megfeleltetés lehetséges-e egyátalán (Graham és mtsai, 2007).

A hátsó szarv további kimenetét képezik a mélyebb laminákban (lamina III-V) elhelyezkedő projekciós sejtek. Számuk jóval kisebb, mint a lamina I projekciós neuronoké, viszont a spinothalamicus pálya túlnyomó részét − legalábbis a főemlősökben és az emberben − valószínűleg ezeknek a sejteknek az axonjai képezik (Willis és Coggeshall, 2004). Szemben a lamina I projekciós neuronjaival, melyek elhelyezkedésüknél fogva elsősorban Aδ és C rost bemenettel rendelkeznek, s többségükben nociceptívek, addig a mélyebb laminákban helyet foglaló projekciós neuronokon az Aδ és C, ill. az Aβ rostok által szállított információ konvergál (3. ábra), s ezek a sejtek a nociceptív és nem-nociceptív stimulusokra egyaránt reagálnak, ezáltal az ún. WDR (*wide dinamic range*) neuronok egy csoportját képezik.



3. ábra. A gerincvelő hátsó szarvának neuronalis szerveződése. a) A különböző típusú primer afferens rostok végződési mintázata, valamint a lamina I-IV jellegzetes sejttípusai (Cervero és Iggo, 1980, Brain, 103:717-772 nyomán). b) Hármas immunfluoreszcens festés neuron specifikus sejtmag fehérje (NeuN), NK1-receptor (NK1R) és μ-opioid-receptor (MOR) antitestekkel (Kozsurek és Puskár anyagából). A lamina I és III-V neuronjainak többsége NK1R-t exprimál. Jellegzetes a mélyebb laminákban látható antennasejt (nyíl), melynek dendritjei dorsalisan a felületes laminákig terjednek. A μ-opioid-receptorok a lamina II-ben koncentrálódnak.

2.1.3. A szenzoros információ supraspinalis továbbítása és feldolgozása

A gerincvelőbe beérkező szenzoros és nociceptív információ az agytörzs és az agy számos területét aktiválja, különböző agyi területekre különböző pályákon jutva el. A fájdalmat nem csak érezzük, lokalizáljuk (tractus spinothalamicus → thalamus VPL mag → primer majd szekunder érzőkéreg), de a kellemetlen érzés befolyásolja viselkedésünket, közérzetünket és meghatározó emléknyomot hagy hátra (tractus spinoreticulothalamicus → agytörzsi formatio reticularis → thalamus középvonali magjai → limbikus rendszer, elülső cingulum, prefrontalis kéreg), hatást gyakorol az autonóm idegrendszerre (tractus spinoreticularis → agytörzsi noradrenerg magok, nucleus tractus solitarii → hypothalamus és limbikus rendszer), hormonrendszerünk egyes komponenseire (tractus spinohypothalamicus) és védekező-elhárító reflexeket vált ki. Ugyanakkor az idegrendszer a fájdalom érzékelése, „tudomásul vétele” után, lényegében a válaszreakciók szervezésével egyidőben igyekszik mérsékelni a fájdalominger által kiváltott szenvedést: a nociceptív információ olyan területekre is megérkezik (tractus spinomesencephalicus → substantia grisea centralis, középagyi formatio reticularis, tectum), amelyekből leszálló rostok a gerincvelőben antinociceptív hatást közvetítenek (Palkovits, 2000).

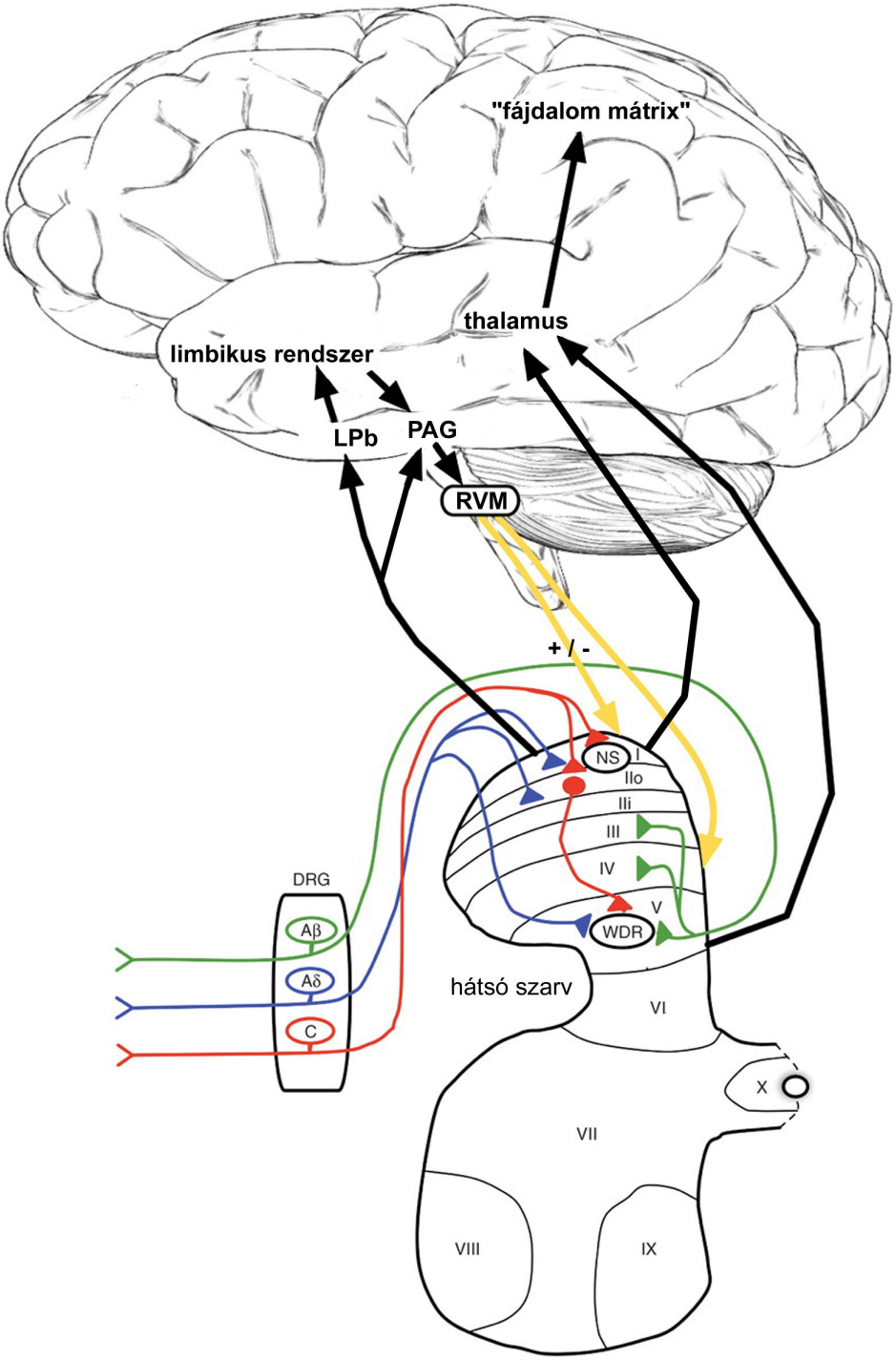
Patkányban a lateralis parabrachialis area és a caudalis ventrolateralis medulla felé történő projekció a legmarkánsabb (ezek körülbelül megfeleltethetők az előbb leírt spinomesencephalicus és spinoreticularis pályáknak): az ide injektált retrográd tracer jelöli a legtöbb projekciós sejtet a gerincvelőben. A főemlősökben meghatározó tractus spinothalamicus patkányban feltehetően kisebb jelentőséggel bír (Lima és Coimbra, 1988; Marshall és mtsai, 1996; Spike és mtsai, 2003; Todd és mtsai, 2000).

2.1.4. Agytörzsi leszálló pályák hatása a hátsó szarv neuronhálózataira

Az agytörzsből két nagyobb pályarendszer száll lefelé a gerinvelő hátsó szarvába, hogy a szenzoros és főleg nociceptív információ feldolgozását befolyásolja (4. ábra). A rostralis ventromedialis medullából leszálló rostok szerotoninergek, s excitatoros hatásuk elsősorban az 5-HT_3-receptoron keresztül érvényesül, melyek legnagyobb számban a vékony primer afferens rostvégződéseken találhatók meg (Ali és mtsai, 1996; D'Mello és Dickenson, 2008; Millan, 2002; Zeitz és mtsai, 2002). Emellett nagyszámú szerotonin-tartalmú végződést mutattak ki NK1R-t exprimáló projekciós neuronokon mind a lamina I-ben, mind a mélyebb laminákban (Polgar és mtsai, 2002; Stewart és Maxwell, 2000).

A másik nagy leszálló rostrendszer az agytörzs noradrenerg magcsoportjaiból – köztük a locus coeruleusból – származik. Szemben a szerotoninerg leszálló rostokkal, a noradrenerg pálya gátolja a nociceptív információ továbbítását. A hatás a primer afferens végződések α_2-receptorain keresztül érvényesül: mérséklődik a primer afferensekből a neurotranszmitter felszabadulása és a projekciós sejtek tüzelésének intenzitása (Millan, 2002).

Lényegében tehát két spino-bulbo-spinalis hurokról beszélhetünk: a lamina I projekciós neuronjainak ingerülete eléri az agytörzset (Suzuki és mtsai, 2002), majd az onnan leszálló rostok a hátsó szarvban végződnek. Ezáltal az agytörzs mind serkentő, mind gátló hatást képes gyakorolni a gerincvelői hátsó szarvban zajló, nociceptív információfeldogozással kapcsolatos folyamatokra. A szerotoninerg (5-HTT, szerotonin transzporter-tartalmú) és noradrenerg (DβH, dopamin-β-hidroxiláz-immunreaktív) rostok által szállított serkentő és gátló hatások egyensúlyának elbillenése az egyik vagy másik oldal irányába alapvetően meghatározhatja egy a gerincvelőbe bejutó stimulus további sorsát (D'Mello és Dickenson, 2008; Millan, 2002).



4. ábra. A gerincvelői szenzoros és nociceptív információfeldolgozás agytörzsi kontrollja. A lamina I túlnyomórészt nociceptív-specifikus (NS) és a lamina III-V polimodális (WDR) neuronjai olyan agytörzsi területekre projiciálnak, mint a lateralis parabrachialis area (LPb) vagy a periaqueductalis szürkeállomány (PAG). Az agytörzsből (például a rostralis ventralis medullából, RVM) visszacsatoló noradrenerg és szerotoninerg pályák, melyek a limbikus rendszer kontrollja alatt állnak, a hátsó szarvban történő információfeldolgozást részben gátlás, részben serkentés útján modulálják. A nociceptív információ végül a „fájdalom mátrixként" összegzett kérgi területekre (primer és szekunder szomatoszenzoros kéreg, prefrontalis kéreg, insula, a cingulum elülső része) jut (D'Mello és Dickenson, 2008, Br J Anaesth, 101:8-16 alapján).

2.1.5. Klinikai vonatkozások

Időbeli lefolyását tekintve a fájdalom lehet akut vagy krónikus. Akut fájdalmat eredményez bármilyen a szöveteket ténylegesen vagy potenciálisan károsító hatás. Az akut fájdalom a szervezetet fenyegető hatás elmúltával vagy az előidézett szöveti károsodás meggyógyulásával párhuzamosan, eredeti célját és szerepét betöltve megszűnik. Klinikai szempontból sokkal nagyobb problémát jelentenek a krónikus fájdalom szindrómák. Ezekben a fájdalom a károsító hatás megszűnése vagy a szöveti sérülés gyógyulása után tartósan és lényegében céltalanul áll fenn. Ma sem teljesen tisztázott, mi okozza a fájdalom akutból krónikusba történő transzformációját, egyátalán, az sem biztos, hogy a krónikus fájdalmat minden esetben akut fájdalom előzi-e meg (Vadivelu és Sinatra, 2005).

A fájdalom krónikussá válását okozhatja a nociceptorok ingerküszöbének tartós csökkenése, ingerlékenységének hosszútávú fokozódása. Ebben az esetben perifériás szenzitizációról beszélünk. Gyulladásos reakcióban például a nociceptorok szintjén kifejezett protein-kináz A és C aktiválódás észlelhető. Ezek az enzimek a TRPV1-receptorokat foszforilálják, így azok ugyanakkora fájdalmas stimulusra intenzívebben reagálnak (Bhave és mtsai, 2002; Bhave és mtsai, 2003).

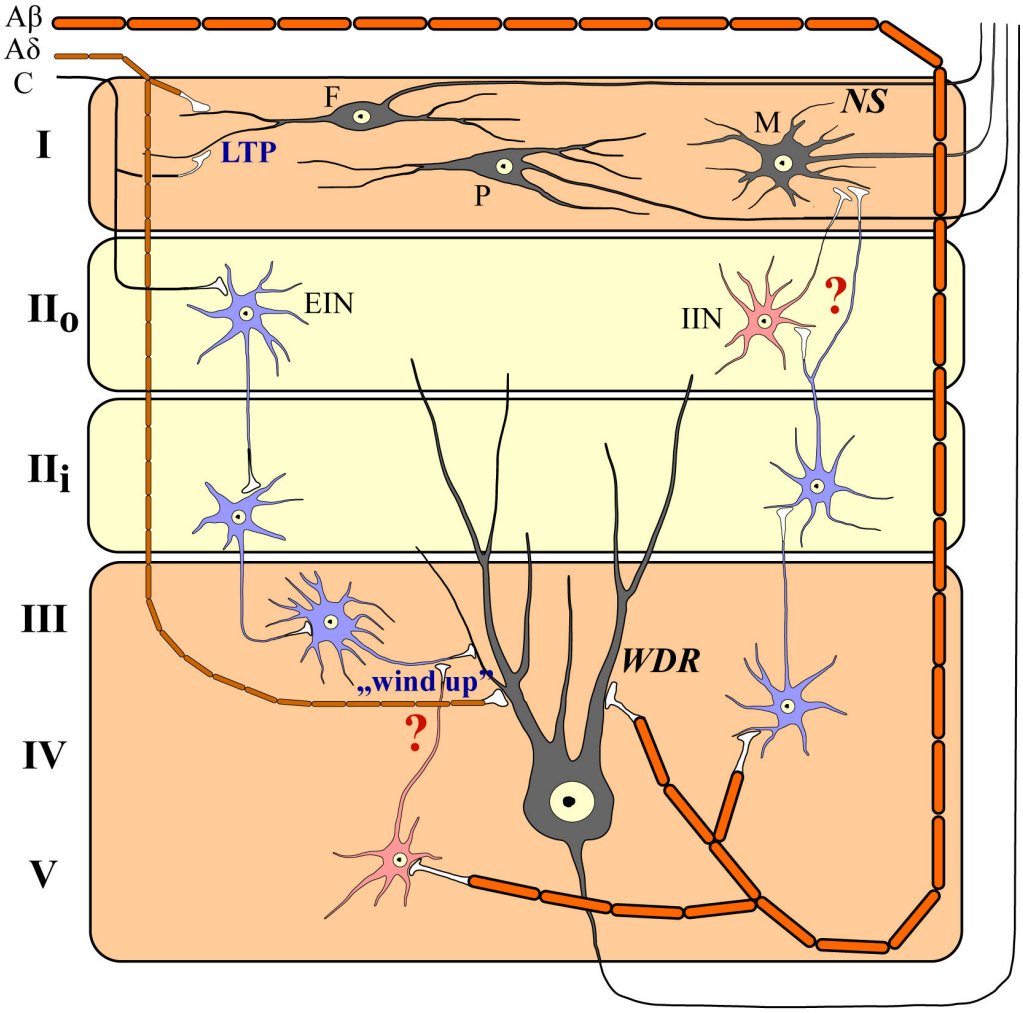
A krónikus fájdalom hátterében állhat a centrális szenzitizáció is, amikor is a központi idegrendszer neuronalis köreinek érzékenysége és aktivitása tartósan vagy irreverzibilisen fokozódik (D'Mello és Dickenson, 2008; Pockett, 1995; Sandkuhler, 2007). A C rostok többsége SP-t tartalmaz és a felületes laminákban végződik. Jelentős hányaduk közvetlenül szinaptizál a lamina I NK1R-pozitív neuronjain, melyek egy része projekciós sejt. A C rostok ismételt vagy elhúzódó stimulációja preszinaptikusan fokozott glutamát felszabadulást, posztszinaptikusan pedig a lamina I NK1R sejtjei esetében fokozott ingerlékenységet eredményez. Az LTP-nek (long term potentiation) nevezett jelenség kulcsmolekulája az NMDA-típusú glutamát-receptor. Az érző idegvégződésekből felszabaduló glutamát normális körülmények között főleg a gyors AMPA-receptoron keresztül hat, depolarizálja a posztszinaptikus membránt. A stimulus ismétlődése vagy elhúzódása esetén az ugyancsak ismétlődő vagy elhúzódó depolarizáció hatására az NMDA-receptorok felszabadulnak a Mg^{2+}-ionok blokádja alól. A megnyíló NMDA-receptorokon keresztül Ca^{2+}-ionok lépnek be a sejtbe, s a megnövekedett Ca^{2+}-koncentráció számos szignáltranszdukciós útvonalat indít el,

melynek eredményeképp foszforilálódnak és így érzékenyebbé válnak a meglévő AMPA-csatornák, később pedig újonnan szintetizált AMPA-receptorok épülnek be a membránba (Bleakman és mtsai, 2006; Garraway és mtsai, 1997; Ji és mtsai, 2003; Liu és Sandkuhler, 1995; Randic és mtsai, 1993; Rygh és mtsai, 2005; Sandkuhler, 2007; Svendsen és mtsai, 1998). Az NMDA-receptorok esetén a tartós vagy elhúzódó depolarizáció elengedhetetlen a Mg^{2+}-blokk feloldásához, és ezt a folyamatot nagymértékben elősegíthetik a primer afferensekből felszabaduló neuropeptidek, mint a CGRP vagy a SP (Budai és Larson, 1996; Khasabov és mtsai, 2002).

A gerincvelőben az LTP-n túl létezik egy másik mechanizmus is, mely centrális szenzitizációt eredményezhet. Az ún. *„wind up”* (Pockett, 1995) lényege, hogy a hátsó gyökereket C rost ingerküszöböt meghaladó, alacsony frekvenciájú, néhány másodpercig tartó sorozatimpulzussal ingerelve a hátsó szarv neuronjaiban percekig tartó kumulatív depolarizáció jön létre, és az egyetlen stimulussal kiváltott akciós potenciálok száma a hátsó szarvi neuronokban progresszív növekedést mutat (Mendell, 1966). A „wind up” esetében, akárcsak az LTP kialakulásában meghatározó jelentőségű az NMDA-receptor. A „wind up” és az LTP kialakulásához is szükség van SP-re és NK1R-ra. A két mechanizmus közötti alapvető különbség, hogy a „wind up” inkább percekig, az LTP órákig, napokig, hetekig sőt hónapokig tarthat. Míg az LTP inkább a lamina I (többségében nociceptív) sejtjein jelenik meg, addig a „wind up” főként a mélyebb laminákban (zömében WDR neuronokon) észlelhető. Nem kizárt, hogy az akut fájdalom krónikussá válása hátterében a „wind up” LTP-vé történő transzformációja áll (Herrero és mtsai, 2000).

A krónikus fájdalom – legyen szó gyulladásos, sérüléses vagy neuropátiás eredetről – vezető tünete a hyperalgesia (a fájdalmas stimulusokkal szemben mutatott alacsonyabb ingerküszöbb) ill. az allodynia (nem fájdalmas ingerek fájdalmasként történő megélése). A hyperalgesia kialakulását egyaránt magyarázhatja a perifériás szenzitizáció és a lamina I neuronjaiban kialakuló LTP (centrális szenzitizáció). A lamina I projekciós sejtjein főleg C és Aδ rostok végződnek. Ugyanakkor a lamina I a hátsó szarv mélyebb régiói felől poliszinaptikus Aβ bemenettel is rendelkezik, melyet normális körülmények között a GABA-erg interneuronok legátolnak (Torsney és MacDermott, 2006). A mélyebb laminák WDR neuronjai monoszinaptikus Aβ és Aδ, valamint poliszinaptikus C afferentációval rendelkeznek. A poliszinaptikus C rost

bemenetet Aβ rostok által indukált gátló mechanizmusok tartják kontroll alatt (Craig, 2003b; Melzack és Wall, 1962; 1965). A gátlás megszűntetése GABA- és glicin-antagonistákkal az allodynia tüneteit eredményezi (Yaksh, 1989): egyrészt a mély laminákban a WDR projekciós neuronokon megnő a C rost bemenet jelentősége, másrészt az Aβ rostok által szállított nem-nociceptív információ a zömében nociceptív lamina I neuronokra, köztük projekciós sejtekre tevődik át. A gátló neuronok normális működésének kiesése vagy károsodása központi jelentőséggel bírhat a krónikus fájdalom gyulladásos (Harvey és mtsai, 2004), ideg- (Moore és mtsai, 2002), ill. gerincvelő sérülésből (Drew és mtsai, 2004) eredő formáinál egyaránt (5. ábra).



5. ábra. A hátsó szarv krónikus fájdalom szindrómákat magyarázó modellje. A fájdalom krónikussá válását egyaránt magyarázhatja a hátsó szarvi sejtek fokozott ingerlékenysége (centrális szenzitizáció: LTP, „wind up”), ill. a gátló interneuronok működésének elégtelensége. F, P, M: a lamina I fuziform, piramis alakú, ill. multipoláris, többnyire nociceptív-specifikus (NS) projekciós sejtjei. A mélyebb laminák projekciós sejtjein a nociceptív és nem nociceptív input konvergál (WDR). EIN, IIN: excitatoros, ill. inhibitoros interneuron.

2.2. Kokain- és amfetamin-regulált transzkript: a géntől a peptidekig

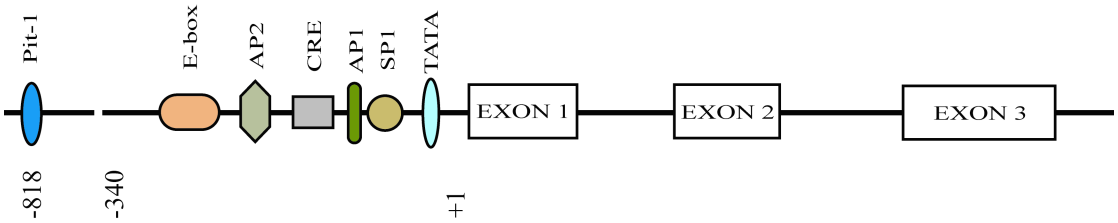
Douglass és munkatársai (1995) arra keresték a választ, hogy a pszichostimuláns hatású kábítószerek alkalmazása során mely agyi területeken milyen gének aktiválódnak. A specifikusan aktiválódó géneknek ugyanis az élvezeti szerek fogyasztása során szinte mindig megjelenő dependencia és tolerancia kialakulásában lehet szerepe. Akut kokain- és amfetaminbevitelt követően a patkányokban egy új mRNS-t találtak, melynek koncentrációja a striatumban a pszichostimulánsok hatására az eredeti érték 3-4-szeresére emelkedett. Az újonnan izolált mRNS-t a felfedezéséhez vezető kísérletek alapján nevezték el *kokain- és amfetamin-regulált transzkriptnek*, *CART-nak*. Azonban hamarosan nyilvánvalóvá vált, hogy a transzkript és az az alapján képződő fehérjetermékek a központi és perifériás idegrendszer számos területén jelen vannak, s nagyon sokféle élettani folyamat szabályozásában játszanak meghatározó szerepet.

2.2.1. A CART gén

A CART gén szerkezetét az elmúlt évtized során számos állatfajban tanulmányozták, s mára az ember (5. kromoszóma, 5q13-14 régió), a szarvasmarha, a patkány, az egér (13. kromoszóma), sőt az aranyhal CART gén szekvenciája is ismertté vált. A három exont és két intront tartalmazó gén szerkezete az evolúció során alig változott: ha csak a kódoló régiókat nézzük, a patkány és az egér CART gén nukleotid szekvenciája 98%-ban egyezik, de a hasonlóság a patkány és az emberi CART gén között is 91%-os (Adams és mtsai, 1999; Dominguez, 2006; Douglass és mtsai, 1995; Douglass és Daoud, 1996; Kuhar és mtsai, 2002; Valle és mtsai, 2005; Volkoff és Peter, 2001).

A CART gén promoter szekvenciája számos kötőhelyet tartalmaz a különféle transzkripciós faktorok számára (6. ábra). A nagyszámú kötőhely alapján feltételezhető, hogy többféle szignáltranszdukciós útvonal is képes befolyásolni a transzkripciót. Mai ismereteink szerint a CART mRNS képződése leginkább a cAMP reszponzív elem (CRE, cAMP responsive element) nevű kötőhelyen keresztül befolyásolható: a cAMP szint növekedése a protein-kináz A aktiválódásához vezet, mely foszforilálja a cAMP reszponzív elemet kötő fehérjét (CREB, cAMP responsive element binding protein). A

foszforilált CREB kapcsolódik a CART promoter CRE helyéhez, s fokozza az mRNS képződését (Carlezon és mtsai, 1998; Dominguez és mtsai, 2002; Jones és Kuhar, 2006; Konradi és mtsai, 1994; Lakatos és mtsai, 2002).



6. ábra. A CART gén szerkezete. A CART gén három exont és két intron tartalmaz. A kódoló régiók előtt található kb. 820 bázispár hosszúságban a gén promotere, mely számos, a transzkripciót szabályozó specifikus kötőhelyet tartalmaz: a TATA-boksz szükséges a DNS-dependens RNS-polimeráz bekötődéséhez, a CRE a cAMP-dependens, ún. protein-kináz A által foszforilált CREB fehérje kötőhelye, a Fos és Jun fehérjék pedig az AP1-hez kapcsolódva fejthetik ki hatásukat (Dominguez és mtsai, 2002, J Neurochem, 80:885-893 alapján).

Ma már néhány az emberi CART gént érintő mutáció is ismert: egyesek az elhízással, csökkent glükóz toleranciával és II. típusú diabetes mellitusszal hozhatók összefüggésbe (del Giudice és mtsai, 2001; Dominguez és mtsai, 2004; Yanik és mtsai, 2006), mások az alkoholizmusra való hajlamot fokozzák (Jung és mtsai, 2004).

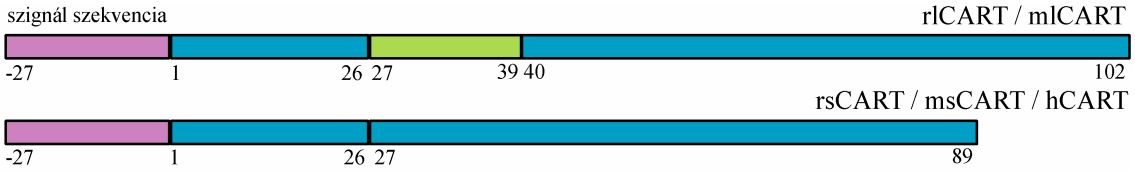
2.2.2. A CART mRNS

Rágcsálókban az alternatív splicing következtében a CART génről kétféle mRNS-variáns is képződhet: a rövidebb mRNS nem tartalmazza a második exon legelején álló 39 nukleotidnak megfelelő kópiát, azaz 13 aminosavval kevesebbet kódol. A hosszabb mRNS az úgynevezett *rat long (rl) CART*, míg a rövidebb a *rat short (rs) CART*-nak nevezett transzkript. Egérben az ezekkel analóg *mouse long (ml) CART*-ról, ill. *mouse short (ms) CART*-ról beszélhetünk (Adams és mtsai, 1999; Dominguez, 2006; Douglass és mtsai, 1995). Emberben nem sikerült splice-variánsokat azonosítani, a *humán (h) CART* mRNS szerkezetileg a rágcsálókban megtalálható rövidebb változatnak, azaz a *rsCART*-nak, ill. az *msCART*-nak felel meg (Douglass és Daoud, 1996).

2.2.3. A CART peptidcsalád

Érdekes módon az első CART peptidet Spiess és munkatársai már 1981-ben leírták a birka hypothalamusában, de akkor még mint „szomatosztatinszerű fehérjét” említették (Spiess és mtsai, 1981). Felfedezésük nem keltett komolyabb visszhangot, és 15 év telt el, míg Douglass és munkatársai (1995; 1996) kísérletei nyomán a peptidcsalád a figyelem középpontjába került, s megkapta ma is használatos nevét.

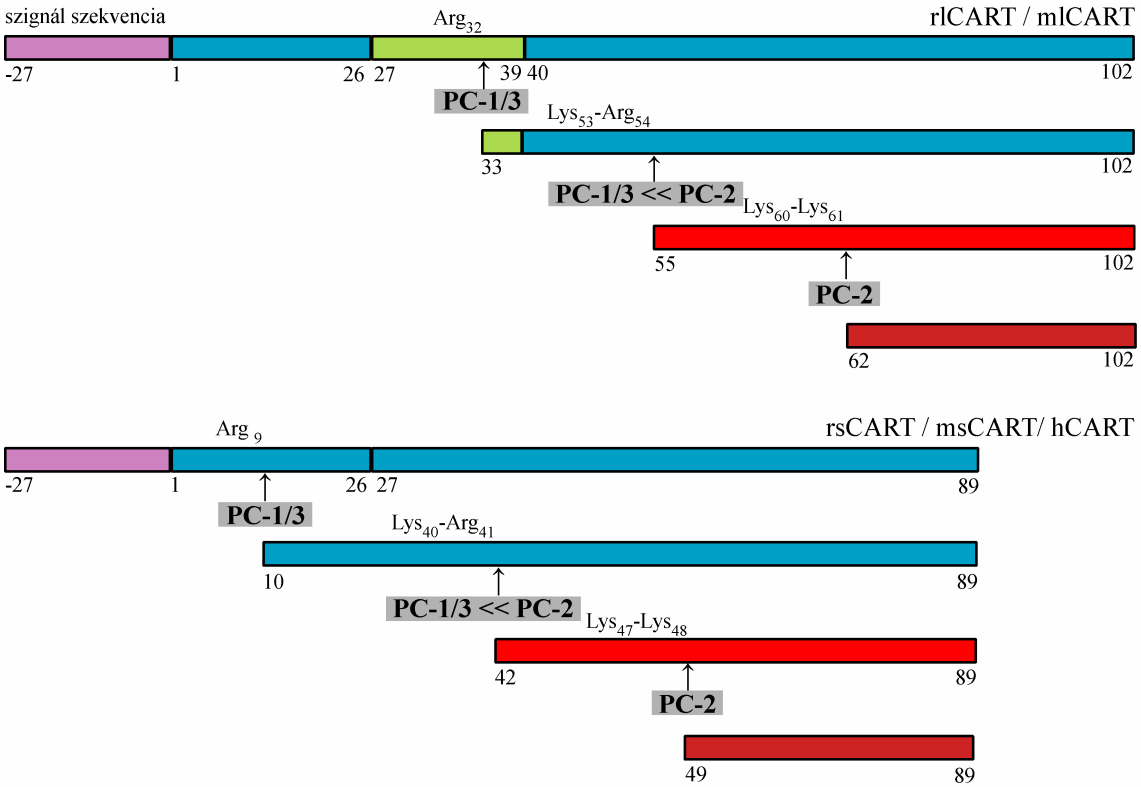
Az elmúlt másfél évtized során többféle CART peptidet azonosítottak (Dylag és mtsai, 2006; Kuhar és Yoho, 1999). A különböző fehérjeváltozatok részben az mRNS-t érintő alternatív splicing miatt, részben a keletkezett peptidek posztranszlációs modosulásának, leggyakrabban enzimatikus hasításának következtében jönnek létre. Rágcsálókban a két mRNS splice-variánsnak köszönhetően két ún. preproCART képződik: a hosszabb 129, a rövidebb 116 aminosavat tartalmaz. A 27 aminosavból álló szignál szekvencia enzimatikus lehasadása után jön létre a 102, ill. 89 aminosavat tartalmazó proCART. Emberben – mivel csak a rövidebb mRNS létezik – egyedül a 116 aminosav hosszúságú preproCART, ill. a 89 aminosavból álló proCART van jelen (7. ábra).



7. ábra. Az egy mRNS kétféle splice-variánsa által kódolt preproCART fehérjék szerkezete. Fent: a rágcsálók 39 nukleotiddal hosszabb mRNS-éről (rlCART / mlCART) képződő peptid. Lent: a rövidebb rágcsáló mRNS-ről, ill. az emberi transzkriptről (rsCART / msCART / hCART) átíródó fehérjetermék. A fenti ábrán zöld színben láthatók azok az aminosavak (27-39), melyeket a hosszabb splice-variáns 39 nukleotidból álló inzertje kódol (Stein és mtsai, 2006, Peptides, 27:1919-1925 nyomán).

A proCART molekulákból a különböző kálcium-dependens szerin-proteázok, az ún. prohormon-konvertáz enzimek (PC) hatására jönnek létre a biológiailag aktív fragmentumok (Dey és mtsai, 2003; Dylag és mtsai, 2006; Stein és mtsai, 2006; Thim és mtsai, 1999). A PC-1/3 enzim elsősorban az ún. intermedier CART peptidfragmentumok, a CART(33-102) és a CART(10-89) képződésében játszik szerepet, a PC-2 pedig a fehérjeláncot tovább hasítva hozza létre a rövidebb, biológiailag aktív peptideket (8. ábra). Különböző szövetféleségekben eltérő a PC-1/3 és

a PC-2 enzim expressziója. A két enzim egymáshoz viszonyított aránya alapvetően befolyásolja, hogy egy adott szövetben melyik CART peptidfragmentum mekkora mennyiségben lesz jelen (Thim és mtsai, 1999).



8. ábra. CART peptid fragmentumok rágcsálókban és az emberben. A PC-1/3 enzim hatására a proCART-ból keletkezik az intermedier CART(33-102) és CART(10-89) fragmentum, melyeket a PC-2 enzim hasít tovább rövidebb, biológiailag aktív peptidekre. Az ábra alapján világosan látható, hogy a CART(55-102) teljesen azonos a CART(42-89)-cel, ill. a CART(62-102) a CART(49-89)-cel. A szakirodalomban párhuzamosan használt, és emiatt sokszor zavaró kétfajta számozást az magyarázza, hogy a hosszabb splice-variáns alapján képződő peptidtermékekben a 39 nukleotidból álló inzert miatt az aminosavak sorszáma a 26. hely után „megcsúszik" (Dey és mtsai, 2003, J Biol Chem, 278:15007-15014 nyomán).

A CART gén az evolúció során alig változó szekvenciája a kódolt fehérjék aminosavsorrendjének konzervatív voltában is tükröződik (9. ábra). Az emberi és a rövidebb rágcsáló preproCART között 95%-os a hasonlóság (Dominguez, 2006; Douglass és Daoud, 1996). Az egyes fajok között a legtöbb aminosav eltérés a szignál szekvencia területére esik, tehát egy olyan szakaszra, mely amúgy is lehasad, tehát az aktív peptidfragmentumok szerkezete és funkciója szempontjából nem rendekezik különösebb jelentőséggel. Ugyanakkor a harmadik exon által kódolt, a peptid C-

terminálisa felé eső és biológiai hatással rendelkező rész aminosav sorrendje az emlősökben csaknem 100%-ig azonos (Dylag és mtsai, 2006; Kuhar és mtsai, 2000).

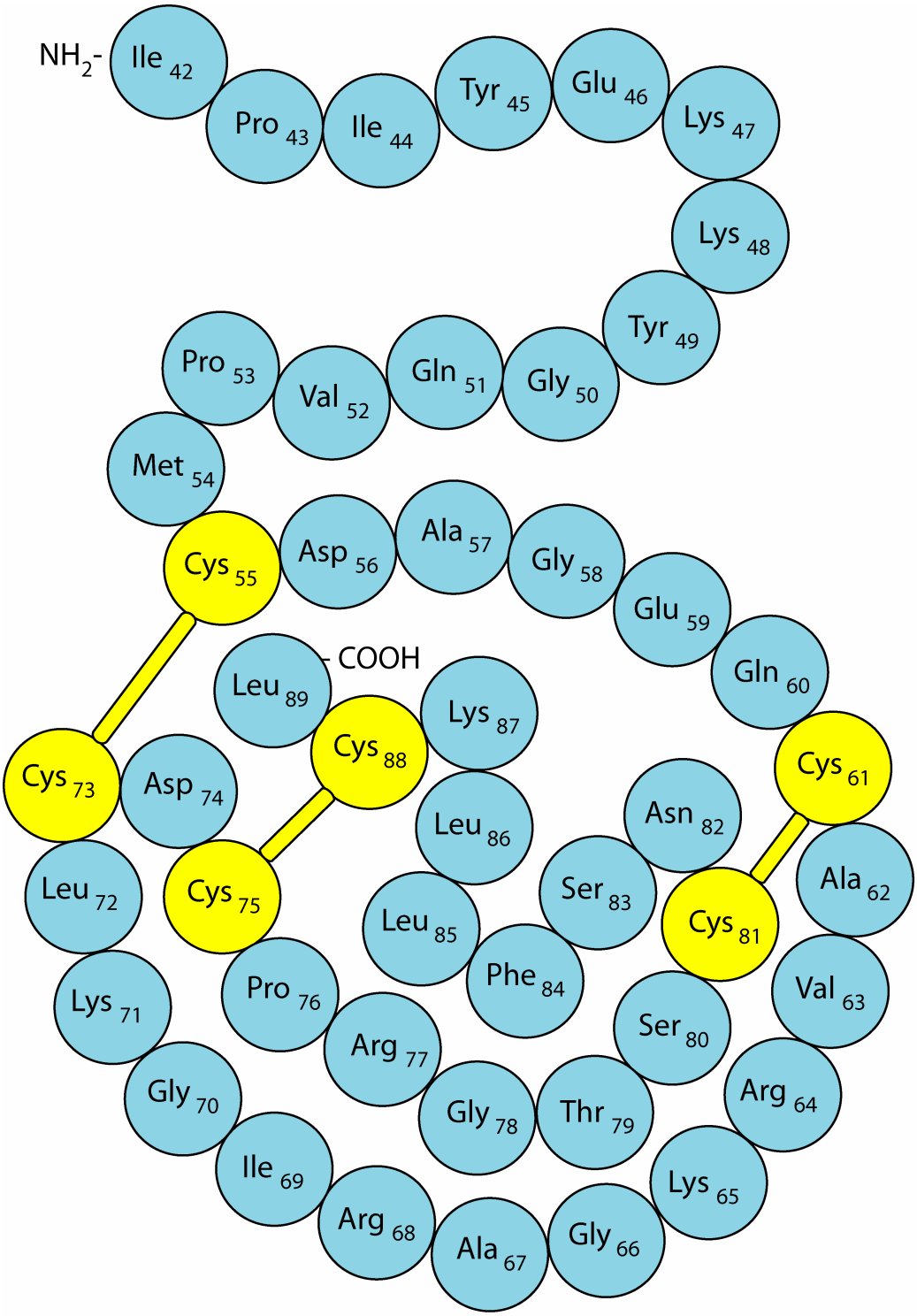
```
mlCART   MESSRLRLLPLLGAALLLLLPLLGARA
msCART   MESSRLRLLPLLGAALLLLLPLLGARA
rlCART   MESSRLRLLPVLGAALLLLLPLLGAGA        szignál szekvencia
rsCART   MESSRLRLLPVLGAALLLLLPLLGAGA
hCART    MESSRVRLLPLLGAALLLMLPLLGTRA
                                                                  aminosav
                                                                  sorszám
mlCART   QEDAELQPRALDIYSAVDDASHEKELPRRQLRAPGAMLQIEALQEVLKKLKSKR   54
msCART   QEDAELQPRALDIYSAVDDASHEKEL            IEALQEVLKKLKSKR   41
rlCART   QEDAELQPRALDIYSAVDDASHEKELPRRQLRAPGAVLQIEALQEVLKKLKSKR   54
rsCART   QEDAELQPRALDIYSAVDDASHEKEL            IEALQEVLKKLKSKR   41
hCART    QEDAELQPRALDIYSAVDDASHEKEL            IEALQEVLKKLKSKR   41

mlCART   IPIYEKKYGQVPMCDAGEQCAVRKGARIGKLCDCPRGTSCNSFLLKCL        102
msCART   IPIYEKKYGQVPMCDAGEQCAVRKGARIGKLCDCPRGTSCNSFLLKCL         89
rlCART   IPIYEKKYGQVPMCDAGEQCAVRKGARIGKLCDCPRGTSCNSFLLKCL        102
rsCART   IPIYEKKYGQVPMCDAGEQCAVRKGARIGKLCDCPRGTSCNSFLLKCL         89
hCART    VPIYEKKYGQVPMCDAGEQCAVRKGARIGKLCDCPRGTSCNSFLLKCL         89
```

9. ábra. A különböző fajok CART peptidjei közötti hasonlóság. A változatosság leginkább a szignál szekvenciát érinti, míg a biológiailag aktív, a C-terminálist is magukban foglaló fragmentumok az 55. helyen (ill. a másik számozás szerint a 42. helyen) lévő aminosavtól eltekintve a rágcsálókban és az emberben is azonosak (Kuhar és mtsai, 2000, Regul Pept, 89, 1-6 nyomán).

Az eddig azonosított endogén CART peptidek – a CART(42-89) vagy más néven CART(55-102), ill. a CART(49-89) vagy másképpen CART(62-102) – sajátossága a hat cisztein oldallánc, melyek összesen három diszulfid híd létrehozására képesek (Dylag és mtsai, 2006; Kristensen és mtsai, 1998; Thim és mtsai, 1998). A diszulfid hidak (10. ábra) stabilizálják a fehérjemolekula térbeli szerkezetét, s alapvetően szükségesek a biológiai aktivitás megőrzéséhez (Yermolaieva és mtsai, 2001).

Végezetül meg kell jegyezzük, hogy bár sokféle CART peptidfragmentumot írtak eddig le, messze legtöbbet a CART(55-102) peptidet, ill. annak hatásait tanulmányozták. A szakirodalomban elterjedt gyakorlat szerint, amikor a továbbiakban CART peptidről beszélünk, alatta a természetes, endogén, biológiai hatással rendelkező CART(55-102) fehérjét értjük.

A CART gén, a CART mRNS és a CART peptidek nukleotid, ill. aminosav szekvenciájának egymáshoz való viszonyát a 11. ábra foglalja össze.



10. ábra. A legtöbbet tanulmányozott, biológiailag aktív CART peptid vázlatos felépítése. A patkányban és egérben azonos aminosavszekvenciájú CART(42-89) vagy a másik számozás szerint CART(55-102) peptid térbeli szerkezetét három diszulfid-híd stabilizálja, így biztosítva a biológiai aktivitáshoz szükséges konformációt. Az emberi CART petid ettől csak annyiban különbözik, hogy az N-terminálisánál a peptidlánc izoleucin helyett valinnal indul (Thim és mtsai, 1998, FEBS Lett, 428:263-268 alapján).

```
cccgggctctcctccacacccccgtccttcttctccccctccctcttcccggcacccgatttcaaccggctataagaagccggagagcgcagtgcccgag   100

cagcgaggaggtccagaaccATGGAGAGCTCCCGCCTGCGGCTGCTACCCCTCCTGGGCGCCGCCCTGCTGCTACTGCTACCTTTGCTGGGTGCCCGTGC   200
                     M  E  S  S  R  L  R  L  L  P  L  L  G  A  A  L  L  L  L  P  L  L  G  A  R  A

CCAGGAGGACGCCGAGCTGCAGCCCCGAGCCCTGGACATCTACTCTGCCGTGGATGATGCGTCCCACGAGAAGGAGCTGgtcagtatttccctcgcctcg   300
 Q  E  D  A  E  L  Q  P  R  A  L  D  I  Y  S  A  V  D  D  A  S  H  E  K  E  L                          (26)

ggttcccccactggactacc  - - - -  intron  (~340 bp)  - - - -  tgcgctgggctcgcagCCAAGGCGGCAACTTCGGGCTCCCG   700
                                                                            P  R  R  O  L  R  A  P  G   (35)

GCGCTATGTTGCAGATCGAAGCGTTGCAAGAAGTCCTGAAGAAGCTCAAGAGTAAACGCATTCCGATCTACGAGAAGAAGTACGGCCAAGTCCCCATGgt   800
  A  M  L  Q  I  E  A  L  Q  E  V  L  K  K  L  K  S  K  R  I  P  I  Y  E  K  K  Y  G  Q  V  P  M      (54/67)

aaggctccgggttccctttt   - - - - - - - - - - - - - intron  (~900 bp)- - - - - - - - - - - - - - - -

 - - - - - - - -   aaccatcggttgtgttgttgacagTGTGACGCTGGAGAGCAGTGCGCAGTGAGGAAAGGGGCCAGGATCGGGAAGCTGTGT   1800
                                            C  D  A  G  E  Q  C  A  V  R  K  G  A  R  I  G  K  L  C    (73/86)

GACTGTCCCCGAGGAACTTCCTGCAATTCTTTCCTCTTGAAGTGCTTGTGAagggacgacagccgccaccttcggttcccatatttccctctttccccca   1900
D  C  P  R  G  T  S  C  N  S  F  L  L  K  C  L  *                                                       (89/102)

aaggagcgctccattatccctggagcctggctttagcaacaataaagtttgcgttcccctcagagagcggatgggctctttccctgctgcttcaaaataa   2000

aagatttgacattattgtgtgaaggagaatgcctcgaatggtgttggtgtgtgtgcaaagatttcttttcttgttttatccatctgacacattcttgtga   2100

atctttctgggaagaagaggaacttcgttttaaaactgtatttttgtatgtggtgtgtcacaatgagaattagatctagttaatttgggtagatgacatc   2200

acaacccggaaaataaattgccctaaagccacacaaattgaagcatgtacaaattacacataataaagcgtttttaacaattgctcacagtgcatggctc   2300

tttctacataagtaatttaaataggaataataggattaatcatgctgttgttttgaaagagaaatattttaaaaatagctgtctattgggagagcagcac   2400

ctcagctccaaggagttttgatcattaattaggagtgtgttacaccagcttcagtataca   2460
```

11. ábra. A CART cDNS és a CART mRNS nukleotidszekvenciájának, ill. a CART peptidek aminosavsorrendjének viszonya. Kisbetűvel jelölve az intronok, nagybetűvel az exonok nukleotidjai. A tripletek alatt a kódolt aminosavak nevének egybetűs rövidítése szerepel. Lila színű a szignál szekvencia. A két splice-variáns közötti különbség a zölddel jelölt inzert jelenlétéből vagy hiányából adódik. Jobb oldalon a nukleotidok sorszáma, alatta zárójelben a kódolt aminosavak sorszáma olvasható. A szignál szekvencia előtt vastagon kiemelve a TATA-boksz szekvenciája, ahová aDNS-dependens RNS-polimeráz bekötődik a transzkripció során. A fehérjeláncot kódoló cDNS szakasz után aláhúzással jelölve a poly(A) helyek (Adams és mtsai, 1999, Brain Res, 848:137-140 alapján).

2.2.4. A CART peptid: receptorok és szignáltranszdukciós útvonalak

Bár a CART peptidek lassan 15 éve ismertek, az intenzív kutatások ellenére a mai napig nem sikerült azonosítani receptorukat – noha egyes kísérleti eredmények alapján valószínűleg többnek is léteznie kell –, és a CART peptidek által elindított szignáltranszdukciós útvonalak vonatkozásában is igen kevés adat áll rendelkezésünkre.

A specifikus kötőhely létezését többen is leírták: Vicentic és munkatársai (2005) az egér hypophysiséből származó AtT20 sejtvonalban, Maletínská és munkatársai (2007) pedig P12 phaeocromocytoma sejtekben, legutóbb pedig Jones és Kuhar (2008) a nucleus accumbensből készített primer sejtkultúrában számoltak be specifikus CART kötőhelyről.

Yermolaieva és munkatársai (2001) szerint a CART a hippocampus neuronjaiban a depolarizáció során csökkenti a nifedipin érzékeny L-típusú

feszültségfüggő Ca^{2+}-csatornákon keresztül történő kálcium-influxot, s a gátlást feltehetően pertussis toxin érzékeny G-fehérjék közvetítik. Lakatos és munkatársai (2005) a már említett AtT20 hypophysis sejtvonalban a CART peptid hatására bekövetkező, ugyancsak pertussis toxin érzékeny G-fehérjék által közvetített, extracelluláris jelre reguláló protein-kináz (ERK) foszforilációt írtak le. Sarkar és munkatársai (2004) kísérletei a cAMP-PKA-CREB jelátviteli mechanizmus jelentőségét támasztják alá: a cerebrospinalis folyadékba adott CART a CREB kifejezett foszforilációját eredményezte a hypothalamus paraventricularis magjában.

2.3. A CART peptidek által szabályozott élettani folyamatok

A CART peptid megtalálható a táplálékfelvétel szabályozásában szerepet játszó központi idegrendszeri struktúrákban (Elias és mtsai, 2001; Fekete és mtsai, 2004; Koylu és mtsai, 1998; Kristensen és mtsai, 1998; Vrang és mtsai, 1999b). Az intracerebroventricularisan adott CART hatására csökken a táplálékfelvétel, s mérséklődik a neuropeptid Y orexinogén hatása (Kristensen és mtsai, 1998; Lambert és mtsai, 1998), a CART krónikus adagolásakor pedig jelentősen csökken a testtömeg is (Rohner-Jeanrenaud és mtsai, 2002). A CART peptid hatására a hypothalamus paraventricularis magjában fokozódik mind a CRH, mind a TRH felszabadulása, így a CART a CRH-ACTH-kortizol (hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg) és a TRH-TSH-T_3/T_4 (hypothalamus-hypophysis-pajzsmirigy) tengely mentén egyaránt képes hatást gyakorolni az anyagcserére és az energiaháztartásra (Fekete és mtsai, 2000; Lechan és Fekete, 2006; Vrang és mtsai, 2000). A nucleus arcuatusból a gerincvelő intermediolateralis oszlopába projiciáló CART-erg neuronok modulálják a szimpatikus idegrendszer működését, mely a bőrerek, verejtékmirigyek, valamint a barna zsírszövet beidegzése révén szabályozza a hőleadást és hőtermelést (Wang és mtsai, 2000).

A mezolimbikus dopaminerg rendszer az agy jutalmazó-megerősítő rendszerének (reward-reinforcement) anatómiai alapja. Számos adat szól amellett, hogy a különböző kábítószerek ezen rendszeren keresztül váltják ki hatásukat, és ez a rendszer lehet felelős a különböző élvezeti szerekkel kapcsolatos hozzászokás és függő viszony kialakulásáért. A CART és a kábítószerfüggőség közötti kapcsolatot több adat is alátámasztja: egyrészt a CART-ot pszichostimulánsok alkalmazása után sikerült

izolálni, másrészt az alkoholbetegek egy részénél a CART gén mutációi mutathatók ki (Jung és mtsai, 2004), harmadrészt a CART mRNS-t és peptidet nagy mennyiségben találták meg a ventralis tegmentalis areában, a nucleus accumbensben és a lateralis hypothalamusban, vagyis az agy jutalmazó-megerősítő rendszerének meghatározó anatómiai struktúráiban (Douglass és mtsai, 1995; Koylu és mtsai, 1998). A legújabb elképzelések szerint az endogén CART peptid a pszichostimulánsok parciális agonistájaként viselkedhet: önmagában alkalmazva a CART nem túl erős pszichotróp szer, de a nagy dózisban bevitt pszichostimuláns kábítószerek hatását gátolva próbálja meg helyreállítani az egyensúlyt. Ennek tükrében elképzelhető, hogy a jövőben a CART-analóg vegyületek szerepet játszhatnak a kábítószerélvezők terápiájában, függőségük gyógyszeres felszámolásában (Kuhar és mtsai, 2005).

A CART peptid elsősorban a CRH-ACTH-kortizol (hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg) tengely működését befolyásolva játszik szerepet a szervezet stresszre adott válaszának szervezésében (Koylu és mtsai, 1997; 2006). A paraventricularis mag CRH-termelő sejtjein CART-immunpozitív rostvégződéseket írtak le, az intracerebroventricularisan alkalmazott CART pedig ezen sejtek mintegy 90%-ában c-Fos expressziót indukált (Vrang és mtsai, 1999b). Hypothalamusból származó explantátumban CART hatására fokozott CRH felszabadulást mértek, a nucleus paraventricularisba injektált CART pedig megemelte a vérplazma ACTH és kortizol koncentrációját (Stanley és mtsai, 2001).

CART-tartalmú axonterminálisok egyaránt előfordulnak a hypothalamus CRH-, TRH- és GnRH-termelő neuronjain, s a CART fokozza ezekből a sejtekből a hypophyseotrop hormonok felszabadulását (Fekete és mtsai, 2000; Leslie és mtsai, 2001; Vrang és mtsai, 2000; Wittmann és mtsai, 2005). A CART TRH és CRH sejtekre, s ezáltal az egész hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg, ill. a hypothalamus-hypophysis-pajzsmirigy tengelyre gyakorolt hatását a táplálékfelvétel és energiaháztartás, valamint a stresszreakció kapcsán tárgyaltuk. Ezen túlmenően a CART fokozza a GnRH pulzatilis szekréciójának amplitúdóját (Parent és mtsai, 2000) és blokkolja a TRH prolaktin szintézist fokozó hatását (Raptis és mtsai, 2004). A CART jelen van az adenohypophysis gonadotrop sejtjeiben is, s feltehetően parakrin módon is szabályozza a prolaktin szekrécióját (Kuriyama és mtsai, 2004).

A CART fokozza a patkányok és nyulak szívfrekvenciáját és emeli az artériás középnyomást (Hwang és mtsai, 2004; Matsumura és mtsai, 2001). Valószínűsíthető, hogy ezek a szív- és érrendszeri hatások elsősorban indirektek, és a CART általános szimpatikus tónust fokozó hatására vezethetők vissza (Dun és mtsai, 2006). Azonban az agyi erek területén a CART peptid direkt vazokonstrikciós hatását sikerült igazolni, mely endothelsejt- és ET(A) endothelin-receptor dependensnek bizonyult (Iliff és mtsai, 2005).

CART-immunreaktív sejteket és rostokat nagy mennyiségben találtak a gyomor- és bélfalban, főleg a plexus myentericusban (Couceyro és mtsai, 1998; Ekblad és mtsai, 2003; Ekblad, 2006). Jelenleg az egyetlen, a tápcsatornában leírt lokális CART hatás a vastagbél NO által előidézett relaxációjának csökkenése (Ekblad és mtsai, 2003). Úgy tűnik, sokkal jelentősebbek a CART központi idegrendszeren keresztül kifejtett gastrointestinalis hatásai: intracerebroventricularisan alkalmazva a CART gátolja a gyomor sósavszekrécióját és motilitását, fokozza a colon perisztaltikus aktivitását. Feltételezhető, hogy ezek a hatások a CRH termelő neuronok működésére vezethetők vissza, mert CRH antagonisták alkalmazása mellett nem jelentkeznek (Okumura és mtsai, 2000; Tebbe és mtsai, 2004). A CART megtalálható a pancreas vegetatív ganglionjainak neuronjaiban és a Langerhans-szigetek endokrin sejtjeiben is. A CART befolyásolni képes az inzulin szekréciót, és az emberi CART gén mutációi az elhízás mellett csökkent glükóz toleranciához, ill. II. típusú diabetes mellitus kialakulásához vezethetnek (del Giudice és mtsai, 2001; Wierup és mtsai, 2006; Wierup és Sundler, 2006). A CART ezen túlmenően a hasnyálmirigy exokrin részének működésére is hat: fokozza az amiláz elválasztását (Cowles és mtsai, 2001).

A CART peptid hippocampus sejtkultúrában képes elősegíteni a neuronok túlélését és differenciálódását. A hatást feltehetően az agyi eredetű neurotrofikus faktor (BDNF, brain-derived neurotrophic factor) közvetíti (Wu és mtsai, 2006). A CART peptid protektív hatásúnak bizonyult kísérletes fokális agyi ischaemiában, és csökentette a glükóz-oxigén depriváció miatt fellépő neuronpusztulást sejtkultúrában (Xu és mtsai, 2006). A hatás a mitokondriumokon keresztül érvényesül: a CART képes kivédeni a szukcinát-dehidrogenáz és a komplex II aktivitásának, valamint az ATP képződésének csökkenését glükóz-oxigén megvonáskor (Mao és mtsai, 2007). A CART

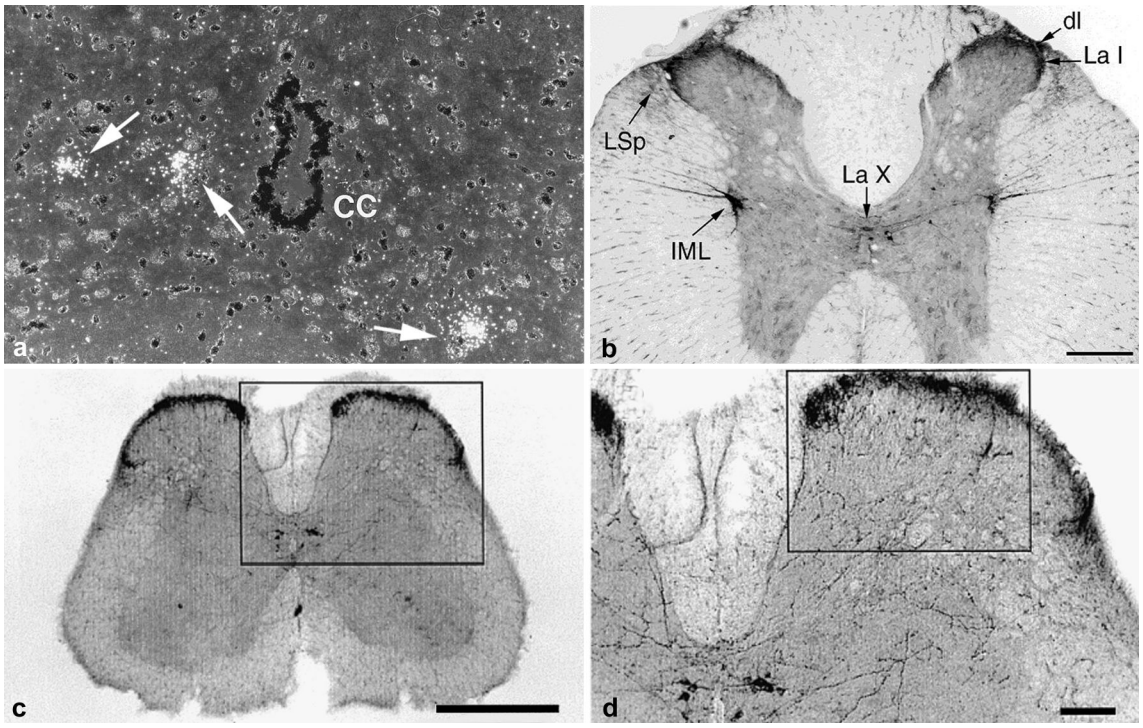
neuroprotektív s neurotrofikus hatásai egyszer talán az agyi ischaemiák és neurodegeneratív kórképek kezelésében játszhatnak szerepet.

A legújabb kutatási eredmények szerint a CART hatással van a csontanyagcserére (Singh és mtsai, 2008) és az immunrendszer működésére is (Bik és mtsai, 2008). A csonttömeget a CART nem mint neuropeptid, hanem mint a vérben keringő hormon befolyásolja: hatására csökken az osteoclastok száma, lassul a csontszövet lebontásának üteme. Az immunrendszer működésére viszont valószínűleg a hypothalamus-adenohypophysis-mellékvesekéreg tengely mentén gyakorol befolyást: átmeneti immunszupresszív majd valamivel hosszabb ideg tartó immunstimuláns hatás jellemzi.

2.4. A CART nocicepcióban betöltött szerepére utaló irodalmi adatok

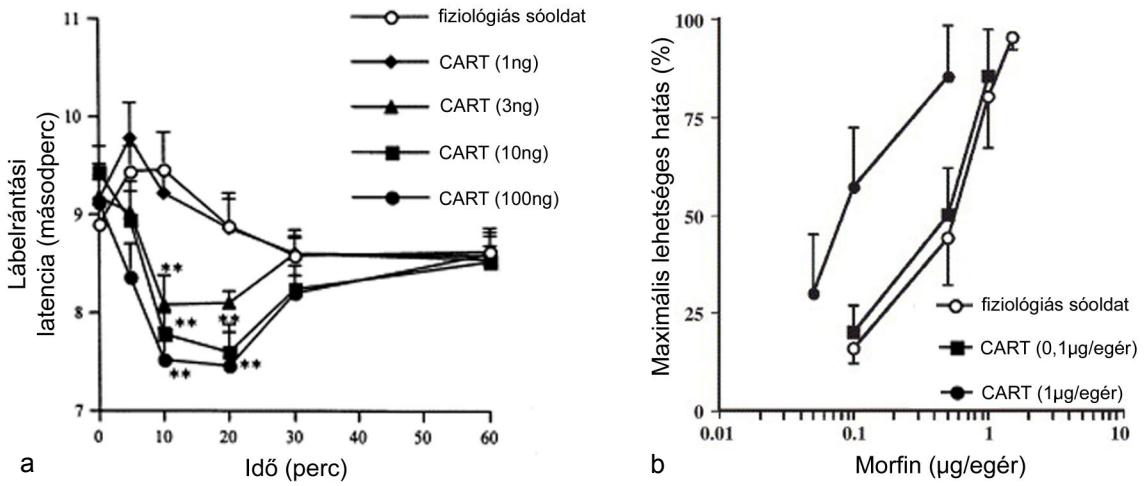
A CART jelenlétét a patkány gerincvelőben elsőként Couceyro és munkatársai (1997) igazolták, néhány CART mRNS-t exprimáló neuront azonosítottak *in situ* hibridizációval a cervicalis és thoracalis szegmentumokban a canalis centralis környékén. Koylu és munkatársai (1998) a központi idegrendszer CART-immunreaktív struktúráinak feltérképezésekor elsőként írták le a patkány gerincvelő nyaki és háti szelvényeiben a lamina I-II, a dorsolateralis köteg és a lateralis spinalis mag erősen festődő rostjait, valamint az intermediolateralis oszlop és a lamina X CART-erg sejtjeit. Ohsawa és munkatársai (2000) az egér gerincvelő teljes hosszában vizsgálták a CART-immunjelölést: a festődés hasonló volt ahhoz, amit Koylu és munkatársai (1998) patkányban leírtak. Ohsawa és munkatársai a felületes laminákban kis CART-pozitív sejtet is megfigyeltek.

A felületes laminák a nociceptív információfeldolgozás és -továbbítás kiemelten fontos területei: itt végződik a nociceptív primer afferensek többsége, s a lamina I-ben helyezkednek el a főként nociceptív-specifikus projekciós neuronok, melyek a fájdalmas stimulusokat a magasabb idegrendszeri központok irányába továbbítják. Az, hogy a CART peptid tömegesen van jelen ezekben a régiókban, szükségszerűen felveti annak lehetőségét, hogy a CART peptid hatással van a fájdalomérzés gerincvelői szintű folyamataira.



12. ábra: CART mRNS és peptid a gerincvelőben. a) *In situ* hibridizáció, a nyilak CART mRNS tartalmú sejtre mutatnak a patkány gerincvelőben, a canalis centralis (CC) környékén (20x nagyítás; Couceyro és mtsai, 1997, J Chem Neuroanat, 4:229-241). b) CART immunreakció a patkány thoracalis gerincvelő szegmentumában (mérték: 200µm; Koylu és mtsai, 1998, J Comp Neurol, 391:115-132). c-d) CART immunreakció az egér gerincvelő lumbalis szelvényében (mérték: 500 µm és 100 µm; Ohsawa és mtsai, 2000, Eur J Pharmacol, 399:165-169).

Ezt támasztották alá a CART fájdalomreakciókra gyakorolt hatását vizsgáló vislekedési tesztek is (13. ábra). Egereket üvegfenekű ketrecekbe tettek, s talpi felszínükre egy nagyteljesítményű izzó sugárzó hőjét fókuszálták, s a besugárzott láb elrántásáig eltelt időt mérték (ún. *lábelrántási* vagy *hindpaw withdrawal teszt*). Az intrathecalisan alkalmazott CART dózisfüggően csökkentette a latenciát: a CART peptid hatására a termális hyperalgesia jelei mutatkoztak (Ohsawa és mtsai, 2000). Mások a CART spinalis szintű hatását az ún *farokcsapás* vagy *tail flick tesztben* vizsgálták. A sugárzó hőt ebben az esetben a farok tövére irányították, s a farokcsapásig eltelt időt regisztrálták. A latenciát a CART önmagában nem befolyásolta, de jelentősen potencírozta a morfin fájdalomcsillapító hatását. CART peptiddel együtt adva a morfin hatáserőssége kb. megkétszereződött, ill. ugyanakkora analgesiás hatás eléréséhez CART peptid mellett kb. ötödakkora dózisú morfinra volt csak szükség (Damaj és mtsai, 2004).

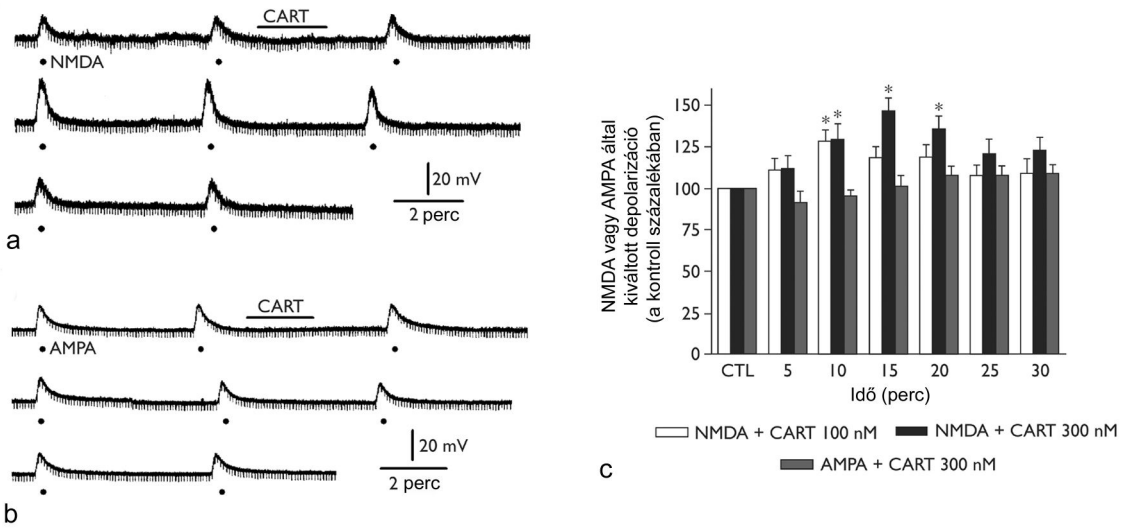


13. ábra: Az i.t. alkalmazott CART peptid hatása a fájdalmas hőingerekkel kiváltott viselkedési válaszokra. a) Lábelrántási tesztben a CART dózisfüggően csökkenti a latenciát (Ohsawa és mtsai, 2000, Eur J Pharmacol, 399:165-169 alapján). b) Farokcsapás tesztben a CART jelentősen potencírozza a morfin analgesiás hatását (Damaj és mtsai, 2004, Brain Res, 1024:146:149 alapján).

Hsun Lin és munkatársai (2005) *in vivo* kísérletekben azt vizsgálták, miként befolyásolja a CART a glutamát agonista NMDA és AMPA által kiváltott termális hyperalgesiát. Eredményeik szerint a peptid önmagában ebben a kísérletben sem idézett elő szignifikáns változást a farokcsapás latenciájában, de jelentősen fokozta a glutamát NMDA-receptorokon keresztül kiváltott nociceptív hatásait, míg az AMPA-glutamáterg transzmissziót érdemben nem befolyásolta. *In vitro* körülmények között, gerincvelő szeleteken végzett whole-cell patch-clamp mérésekben a CART fokozta a hátsó szarvi neuronok NMDA-val kiváltott depolarizációjának mértékét, de nem befolyásolta az AMPA membránt depolarizáló hatását. Mindezek alapján úgy tűnik, hogy a CART szelektíven képes fokozni az NMDA-mediált nociceptív transzmissziót. Az NMDA-receptornak pedig mind a „wind up”, mind az LTP szempontjából meghatározó szerepe van. Mindent összevetve elképzelhető, hogy a CART peptid centrális szenzitizációt indukál, mely klinikailag mint krónikus fájdalom manifesztálódhat.

Damaj és munkatársai (2006) az intrathecalis CART peptid hatását krónikus fájdalom modellekben is vizsgálták: a nervus ischiadicus ligaturájával sérüléses, míg a talp bőrébe injektált carrageenannel gyulladásos fájdalmat váltottak ki. Az idegsérüléses fájdalom modellben a CART mind a magas hőmérséklettel szemben tanusított hyperalgesiát, mind a mechanikus allodyniát jelentősen mérsékelte, viszont a gyulladásos modellben a CART analgetikus hatása elhanyagolható volt. A CART

fájdalomcsökkentő hatása a neuropathiás fájdalomban az ópiát-antagonista naloxon mellett is megmaradt, ami arra utal, hogy a CART nem csak az opioidok hatását fokozva, hanem közvetlenül is befolyásolhatja a nociceptív transzmissziót.



14. ábra: A CART hatása a glutamáterg neurotranszmisszióra. a) Az NMDA által kiváltott depolarizáció amplitúdója megnő CART előkezelést követően. b) A CART jelenléte az AMPA hatására bekövetkező depolarizációt nem befolyásolja. c) A CART NMDA-, ill. AMPA-glutamáterg transzmisszióra kifejtett hatásának időbeli lefolyása. A szignifikáns eltérések csillaggal jelölve (Hsun Lin és mtsai, 2005, Neuroreport, 16:253-257 alapján).

Összességében elmondhatjuk, hogy az erősen CART-immunreaktív rosthálózat jelenléte a gerincvelő felületes lamináiban és a CART fájdalomingerekre adott viselkedési választ befolyásoló hatása együttesen valószínűsíti a CART peptid érintettségét a nociceptív információfeldolgozás komplex folyamataiban. Az is valószínűnek látszik, hogy a CART több támadásponton keresztül képes a fájdalom modulálására: közvetlenül (vagy legalábbis nem opioid-dependens módon) csökkenti a neuropathiás fájdalmat, fokozza az ópiátok közé tartozó morfin analgesiás hatását, ugyanakkor látszólag ezekkel ellentétes, pronociceptív hatást mutat, mikor az NMDA-glutamáterg transzmissziót potencírozza. Az, hogy a pro- vagy az antinociceptív hatás érvényesül, elméletileg lehet a CART koncentrációjának függvénye, vagy az ellentétes hatásokért különböző, ma még nem ismert CART-receptorok lehetnek felelősek.

3. Célkitűzések

A CART peptid nociceptív információfeldolgozásra gyakorolt hatásait viselkedési vizsgálatok támasztották alá. Ugyanakkor ismeretlen volt, hogy mindez pontosan hogyan történik, és milyen kapcsolatrendszereken keresztül illeszkedik a CART peptid a gerincvelő fájdalmas stimulusokat fogadó, feldolgozó és továbbító neuronhálózatainak működésébe.

A gerincvelő egyes szegmentumai funkcionálisan jelentős különbségeket mutatnak. Tekintettel arra, hogy a CART-immunreaktív struktúrákat a gerincvelő teljes hosszában csak egérben írták le, és patkányban csak a cervicalis és thoracalis szegmentumokról publikáltak ilyen jellegű adatokat, első lépésben a CART immunfestődést a patkány gerincvelő teljes hosszában meg kívántuk vizsgálni.

Célunk volt annak meghatározása, hogy a patkány gerincvelő hátsó szarvában a felületes laminákban koncentrálódó, erősen CART-immunpozitív fonat rostjai honnan származnak: primer afferens, lokális interneuron vagy leszálló pálya eredetűek-e, és ha igen, ezek mely altípusaihoz tartoznak.

A lamina I CART-immunreaktív terminálisait elektronmikroszkópos szinten is vizsgáltuk: arra kerestük a választ, szinaptizálnak-e a hátsó szarvban, s ha igen, milyen típusú szinapszisokat hoznak létre, s mik a posztszinaptikus targetek.

Mivel a CART-immunreaktív rostok legsűrűbben a lamina I területén vannak jelen, s mert ugyanitt találhatók azok a projekciós sejtek, melyek a nociceptív információt a supraspinalis központok irányába továbbítják, felmerült a kérdés: a CART-erg rostok közvetlenül végződnek-e a projekciós sejteken, ill. preferálják-e ezek valamely neurokémiai vagy morfológiai altípusát.

4. Módszerek

4.1. Kísérleti állatok

Minden kísérletet 280-320 g tömegű hím Wistar patkányokon végeztünk. Az állatkísérletek tervezése és kivitelezése az European Communities Council 1986. november 24-ei direktívája (86/609/ECC), a Semmelweis Egyetem Egyetemi Állatkísérleti Bizottságának Állatvédelmi Szabályzata és az ÁNTSZ 1809/003/2004. számú engedélye szerint történt. A műtéti bevatkozások során, ill. a transcardialis perfúzió előtt az állatok kellő mélységű narkózisát intramuscularisan adott ketamin (75 mg/ttkg) és xylazin (7,5 mg/ttkg) elegyével biztosítottuk.

4.2. A CART peptid gerincvelői megoszlásának vizsgálata

Három állatot mély altatásban transcardialisan perfundáltunk 0,1M foszfát-pufferben (PB) 4% formaldehidet és 4% akroleint tartalmazó fixálóval (pH=7,4). A cervicalis, thoracalis, lumbalis és sacralis gerincvelőszelvényekből vibratómmal 50 μm vastag, transzverzális metszeteket készítettünk, majd ezeket 50%-os etil-alkohollal kezeltük, hogy elősegítsük az antitestek penetrációját. Ezt követően 1%-os nátrium-borohidrid oldattal közömbösítettük a szabad aldehid-csoportokat. A nem-specifikus antitest kötődések csökkentése érdekében a metszeteket 5% normál lószérumot (NHS, normal horse serum) és 25mM PB-t tartalmazó fiziológiás sóoldatba (PBS) tettük. A metszeteket 72 órán át inkubáltuk monoklonális, egérből származó CART ellenanyaggal (1:1500), majd 24 órán át szamárban termelt és Alexa Fluor 488 fluoreszcens festékkel jelölt egérellenes antitesttel (Invitrogen; 1:500). Mind a primer, mind a szekunder antitestet 0,3% Triton-X 100-at tartalmazó PBS-ben higítottuk. A tárgylemezre felszedett metszeteket Vectashielddel (Vector Laboratories) fedtük le. A szkenneléshez egy Bio-Rad Radiance 2100 Rainbow konfokális lézerpásztázó rendszerrel felszerelt Nicon Eclipse E800 mikroszkópot, ill. 4-szeres nagyítású objektívet használtunk.

4.3. Többes immunfluoreszcens festések a CART peptid tartalmú rostok eredetének meghatározásához

4.3.1. A felületes laminákban végződő velőhüvelyes primer afferensek jelölése

A gerincvelő hátsó szarvában végződő myelinhüvelyes primer afferens rostok (a felületes laminákban kizárólag az Aδ rostok) szelektíven jelölhetők a perifériás idegekbe juttatott kolera toxin β-alegységgel (CTb; List Biological, Campbell, CA, USA). Két, mély altatásban lévő patkány bal nervus ischiadicusát kipreparáltuk és átvágtuk, majd a tracert (5µl, 1%-os desztillált vizes oldatban) az ideg proximalis csonkjába injektáltuk. Háromnapos túlélést követően az állatokat ismételt mély narkózisban 4% paraformaldehid és 1% akrolein elegyével transcardialisan perfundáltuk, majd az L3-L5 szegmentumokból – melyekben a nervus ischiadicus rostjai végződnek – vibratómmal 50 µm vastag metszeteket készítettünk.

4.3.2. Antitest kombinációk

A CTb-vel jelölt két patkányból és további három intakt állatból származó lumbalis metszeteken többes fluoreszcens immunhisztokémiai reakciókat végeztünk a primer afferensekre, lokális interneuronokra és leszálló pályákra jellemző markerekkel. A metszeteket a korábban részletezet módon (lásd 4.2. pont) dolgoztuk fel. A következő antitest kombinációkat használtuk:

(I) egérben termelt CART peptid ellenanyag

(1) kecskében termelt CGRP-ellenes, patkányban termelt SP-ellenes és tengerimalacban termelt vezikuláris glutamát transzporter 2-ellenes antitestekkel;

(2) kecske CGRP-ellenes, nyúl szomatosztatin-ellenes és tengerimalac VGLUT2-ellenes antitestekkel;

(3) kecske CGRP-ellenes antitesttel és biotinilált IB4-gyel;

(4) nyúl anti-CGRP és kecske anti-CTb ellenanyaggal;

(5) tengerimalac VGLUT2-ellenes és nyúl neurotenzin-ellenes antitesttel;

(6) vezikuláris GABA transzporter ellen nyúlban termelt és glicin transzporter 2 ellen tengerimalacban termelt ellenanyaggal;

(7) nyúl szerotonin transzporter-ellenes antitesttel; valamint

(II) nyúlban termelt CART peptid ellenanyag egér dopamin-β-hidroxiláz antitesttel.

Ezt követően a metszeteket szamárban termelt és fluoreszcens festékekkel konjugált szekunder antitestelegyben (Alexa Fluor 488 és Alexa Fluor 555, Invitrogen, 1:500; valamint Cy5 és FITC, Jackson ImmunoResearch, 1:100) inkubáltuk 24 órán át. A (3) kombináció esetében az IB4-kötődést Pacific Blue-konjugált Streptavidinnel (Invitrogen, 1:500) mutattuk ki. (A kísérletekben használt primer antitestek jellemzőit az 1. táblázatban foglaltuk össze.)

A három natív patkány L2-L4 spinalis ganglionjaiból vibratómmal 50 μm vastag longitudinális metszeteket készítettünk, melyeket egérben termelt CART-ellenes, kecskében termelt CGRP-ellenes és patkányban termelt SP-ellenes primer ellenanyag koktélban inkubáltuk a korábban leírt módon (lásd 4.2. pont). A használt szekunder antitestek Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 555 és Cy5 fluoreszcens festékekkel voltak konjugálva.

4.3.3. Analízisek

Minden antitest kombináció esetében az L2-L4 szegmentumokból készült metszetek közül négyet választottunk ki véletlenszerűen. Minden metszet esetében 20-szoros nagyítású objektívvel transzmissziós képeket készítettünk, hogy a lamina I-II-III határok pontosan meghatározhatóak legyenek. Ezután minden metszetben kiválasztottunk és 60-szoros nagyítású lencsével beszkenneltünk három, egyenként 133 μm x 133 μm-es mezőt. A három mező a lamina I-II medialis, középső, ill. lateralis részét fedte le. Minden mezőről 24 optikai metszet került rögzítésre, a lépésköz 0,5 μm volt.

A kolokalizációs analízisekhez a *Neurolucida for Confocal 4.34* szoftvert (MicroBrightField, Williston, VT, USA) használtuk. Minden mező esetében 25-50 (átlagosan 30) CART-immunreaktív boutont választottunk ki és jelöltünk meg véletlenszerűen a lamina I-ben és II-ben egyaránt, majd lézervonalanként és boutonról boutonra ellenőriztük, hogy a megjelölt CART-pozitív terminálisok kolokalizálnak-e a primer afferens, interneuron, ill. leszálló pálya markerekkel. A kolokalizáció hiánya az IB4, GLYT2, CTb, 5-HTT és DβH esetében nyílvánvalóvá vált, amint minden patkányból egy-egy metszetet feldolgoztunk. Ezekben az esetekben a további analízisektől eltekintettünk. Az összes többi antitest kombinációnál mind a lamina I-ben, mind a lamina II-ben 900-1050 CART-immunreaktív bouton kolokalizációját

vizsgáltuk meg (3 patkány, 4 metszet/patkány, 3 mező/metszet, kb. 30-30 bouton/mező).

4.4. A primer afferensek neuropeptid tartalma: a CART peptid, CGRP, SP és galanin kolokalizációjának vizsgálata a lamina I-ben

Három patkányt mély narkózisban transcardialisan perfundáltunk 4% paraformaldehid és 4% akrolein elegyével, s a lumbalis szegmentumokból vibratómmal 50 µm vastag horizontális metszeteket készítettünk, melyeken immunhisztokémiai reakciót végeztünk (lásd 4.2. pont): a primer antitestelegy egérben termelt CART antitestet, kecskéből származó CGRP ellenanyagot, patkány anti-SP ellenanyagot és nyúlban termelt galanin-ellenes antitestet tartalmazott (1. táblázat). Minden patkányból véletlenszerűen választottunk ki 2-3 horizontális metszetet, s ezekből összesen tíz, egyenként 133 µm x 13 3µm-es lamina I mezőt szkenneltünk be 60-szoros nagyítású immerziós objektívvel. Minden mezőből 16-20 optikai metszetet rögzítettünk 0,5 µm-es lépésközzel. Az analízisekhez a Neurolucida for Confocal 4.34 szoftvert használtuk.

Először 900 CGRP-immunpozitív boutont (30 bouton/mező, 10 mező/patkány, 3 patkány) választottunk ki véletlenszerűn, majd boutonról boutonra haladva meghatároztuk, hogy a kiválasztott CGRP-pozitív terminálisok tartalmaztak-e CART-ot, SP-t, ill. galanint. Hasonló módon kiválasztottunk 900 CART-immunreaktív boutont is, s megnéztük, kolokalizálnak-e CGRP-vel és galaninnal.

4.5. A gerincvelő felületes lamináiban végződő CART-immunreaktív terminálisok elektronmikroszkópos vizsgálata

Az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz további négy patkányt perfundáltunk 3% paraformaldehid, 0,15% glutáraldehid és 15% telített pikrinsav elegyével. Az eltávolított lumbalis gerincvelőszegmentumokat krioprotekció céljából 10%-os, majd 30%-os szacharóz-oldatba tettük, azután folyékony nitrogénnel megfagyasztottuk. Felolvadás után a szegmentumokból vibratómmal 50 µm vastag transzverzális metszeteket készítettünk, majd a CART-pozitív struktúrákat vagy immunperoxidáz

reakcióval, vagy az ún. *ezüst-intenzifikált arany* technikával jelöltük (van den Pol, 1986).

Az immunperoxidáz reakciónál a metszeteket 0,5%-os hidrogén-peroxid oldattal kezeltük, majd 72 órán át monoklonális, egérben termelt CART peptid ellenes antitesttel (1:15 000), azután 24 órán át biotinilált, lóban termelt egér ellenes antitesttel (Vector Laboratories, 1:500), s végül 24 órán át tormaperoxidázzal konjugált Extravidinnel (ExtrAvidin-HRP, Sigma, 1:1000) inkubáltuk. A primer és a szekunder ellenanyagokat is 2% NHS-t tartalmazó PBS-sel higítottuk. A kromogén reakciót 0,01% hidrogén-peroxid jelenlétében 0,05% diaminobenzidinnel végeztük.

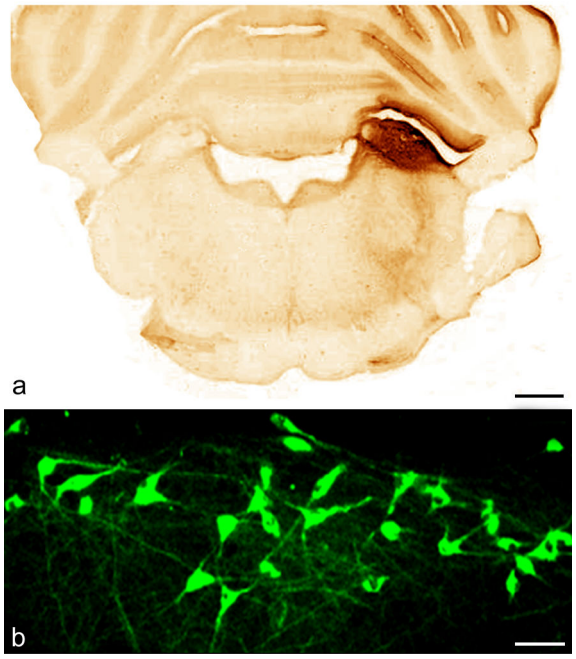
Az ezüst-intenzifikált arany módszernél a monoklonális CART peptid ellenes antitesttel (1:5 000) történő inkubálás után a metszetek szamárban termelt egér ellenes, 1nm-es aranyszemcsékkel konjugált IgG-t (Electron Microscopy Sciences), 1% marha szérum albumint (BSA) és 0,1% hidegvízi hal zselatint (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA) tartalmazó PBS-be, ezután 10 percre 1,25% glutaraldehidbe kerültek. 0,2 M nátrium-citrátos öblítés után az aranyszemcséket az IntenSE Kit (Amersham Biotech) segítségével ezüst-intenzifikáltuk.

Mind az immunperoxidáz reakción, mind az ezüst-intenzifikált arany reakción átesett metszeteket 1% osmium-tetroxid tartalmú PB-ben inkubáltuk fél ótrán át, majd 50%-os etanol, azután 1% uranil-acetátot artalmazó 70%-os etanol következett. A metszeteket felszálló alkoholsorral, majd propilén-oxiddal víztelenítettük és Durcupanba (Fluka) ágyaztuk. Az ultravékony sorozatmetszeteket Formvarral bevont gridekre szedtük fel, majd uranil-acetáttal és ólom-citráttal kontrasztoztunk.

4.6. A CART-immunreaktív rostok végződése a lamina I különböző morfológiájú és neurokémiájú projekciós sejtjein

4.6.1. Sztereotaxiás műtétek

A lamina I-ben elhelyezkedő projekciós sejteket retrográd úton jelöltük a lateralis parabrachialis areaba injektált CTb segítségével. Négy patkányon végeztünk sztereotaxiás műtétet, a következő célkoordinátákat használtuk: a bregmától 9,3 mm-rel hátrafelé, 2,0 mm-rel jobbra, s 6,6 mm-rel lefelé. A CTb 1%-os desztillált vizes oldatát iontoforetikus injekcióval juttattunk a célterületre (5 μA, 15 másodperces 50%-os



15. ábra: A beadási hely az agytörzsben és a jelölt projekciós sejtek a gerincvelő horizontális metszetében. a) Diaminobenzidin reakciótermék a lateralis parabrachialis areának megfelelően, b) CTb-vel retrográd jelölt lamina I projekciós sejtek 1µm-es lépésközzel szkennelt optikai síkokból összevetített képe. Mérték: a) 1 mm, b) 50 µm.

kitöltésű ciklusok 20 percen keresztül). Egy hetes túlélés után az állatokat ismételt mély narkózisban perfundáltuk 4% paraformaldehid és 1% akrolein elegyével.

Az agyból 100 µm vastag metszeteket készítettünk, majd etanol és nátrium-borohidrid kezelés után a metszetek endogén peroxidáz aktivitását 0,5% hidrogén-peroxid oldattal blokkoltuk. Mosás után a metszeteket kecskében termelt CTb ellenanyaggal (1:20 000), majd torma-peroxidázzal konjugált kecskeellenes antitesttel (Vector Laboratories, 1:250) inkubáltuk. A kromogén reakcióhoz 0,01% hidrogén-peroxid jelenlétében 0,05% diaminobenzidint használtunk. Mosás után a metszeteket zselatinos tárgylemezekre szedtük fel, majd száradás után DePeX-szel fedtük le. Ezt követően a beadási helyet fénymikroszkóp alatt ellenőriztük.

4.6.2. A lamina I projekciós neuronjain végződő CART-immunreaktív rostok kvantitatív analízise

A sztereotaxiás műtéten átesett négy patkány L1-L5 gerincvelő-szegmentumaiból vibratómmal 50 µm vastag horizontális metszeteket készítettünk, majd az etanolos és nátrium-borohidrides kezelés után egérben termelt CART-ellenes antitestet, nyúlban termelt NK1R ellenanyagot, tengerimalacban termelt anti-CGRP-t és kecskéből származó CTb antitestet tartalmazó primer eleggyel inkubáltuk a metszeteket. Mosás után lóban termelt biotinilált kecskeellenes szekunder antitest (Vector Laboratories, 1:500), majd ExtrAvidin-HRP (1:500) következett. A CTb festődés amplifikálása céljából a metszeteket 0,01% hidrogén-peroxid jelenlétében biotin-tiraminnal kezeltük (Adams, 1992). Mosás után a metszeteket szamárban termelt és

fluoreszcens festékekkel konjugált szekunder antitestelegyben, valamint Alexa Fluor 488-cal konjugált Streptavidinnel (Invitrogen, 1:500) inkubáltuk.

A sztereotaxiás műtéten átesett négy patkányból származó metszetekben összesen 32 fuziform, 33 piramidális és 31 multipoláris NK1R-immunpozitív, valamint 15 NK1R-t nem exprimáló projekciós (CTb-vel jelölt) neuronról ill. teljes követhető nyúlványrendszeréről készítettünk konfokális sorozatfelvételt. A 60-szoros nagyítású immerziós lencsével és 0,5 μm-es lépésközzel rögzített optikai síkokból a Neurolucida for Confocal 4.34 szoftvercsomag NeuroExplorer 3.30 moduljával rekonstruáltuk a sejtek térbeli struktúráját, ill. meghatároztuk a dendriteken és a szómákon végződő CART-, ill. CGRP-immunreaktív terminálisok felszíni sűrűségét (Todd és mtsai, 2002) A statisztikai próbák esetén minden esetben a $p<0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak.

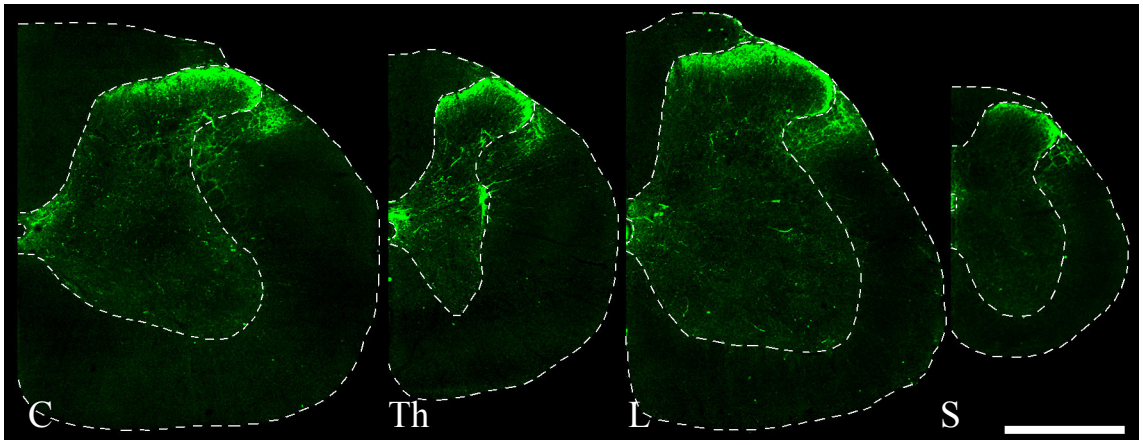
1. táblázat : A gerincvelő és a spinalis ganglinok immunhisztokémiai jelöléseihez használt primer antitestek részletes adatai

Ellenanyag	Faj	Higítás	Forrás
Kokain- és amphetamin regulált transzkript peptid (CART)	egér	1:1500	Jes Thorn Clausen ajándéka (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dánia)
	nyúl	1:1500	Michal J. Kuhar ajándéka (Emory University, Atlanta, USA)
Dopamin-β-hidroxiláz (DβH)	egér	1:150	Millipore (Chemicon)
Galanin (GAL)	nyúl	1:1000	Bachem AG (Peninsula Laboratories)
Glicin transzporter 2 (GLYT2)	tengerimalac	1:2000	Millipore (Chemicon)
Kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP)	kecske	1:300	Santa Cruz Biotechnology
	nyúl	1:300	Merck (Calbiochem)
	tengerimalac	1:2000	Bachem AG (Peninsula Laboratories)
Kolera toxin β-alegység (CTb)	kecske	1:5000	List Biological
Neurokinin-1 receptor (NK1R)	nyúl	1:500	Sigma-Aldrich, Magyarország
Neurotenzin (NT)	nyúl	1:1000	Bachem AG (Peninsula Laboratories)
Szerotonin transzporter (5-HTT)	nyúl	1:250	Merck (Oncogene Research Products)
Szomatosztatin (SOM)	kecske	1:200	Santa Cruz Biotechnology
P-anyag (SP)	patkány	1:200	AbD Serotec (Oxford Biotechnology)
	nyúl	1:300	Merck (Oncogene Research Products)
Vezikuláris GABA transzporter (VGAT)	nyúl	1:1000	Synaptic Systems
Vezikuláris glutamát transzporter 2 (VGLUT2)	tengerimalac	1:5000	Millipore (Chemicon)

5. Eredmények

5.1. A CART peptid gerincvelői megoszlása patkányban

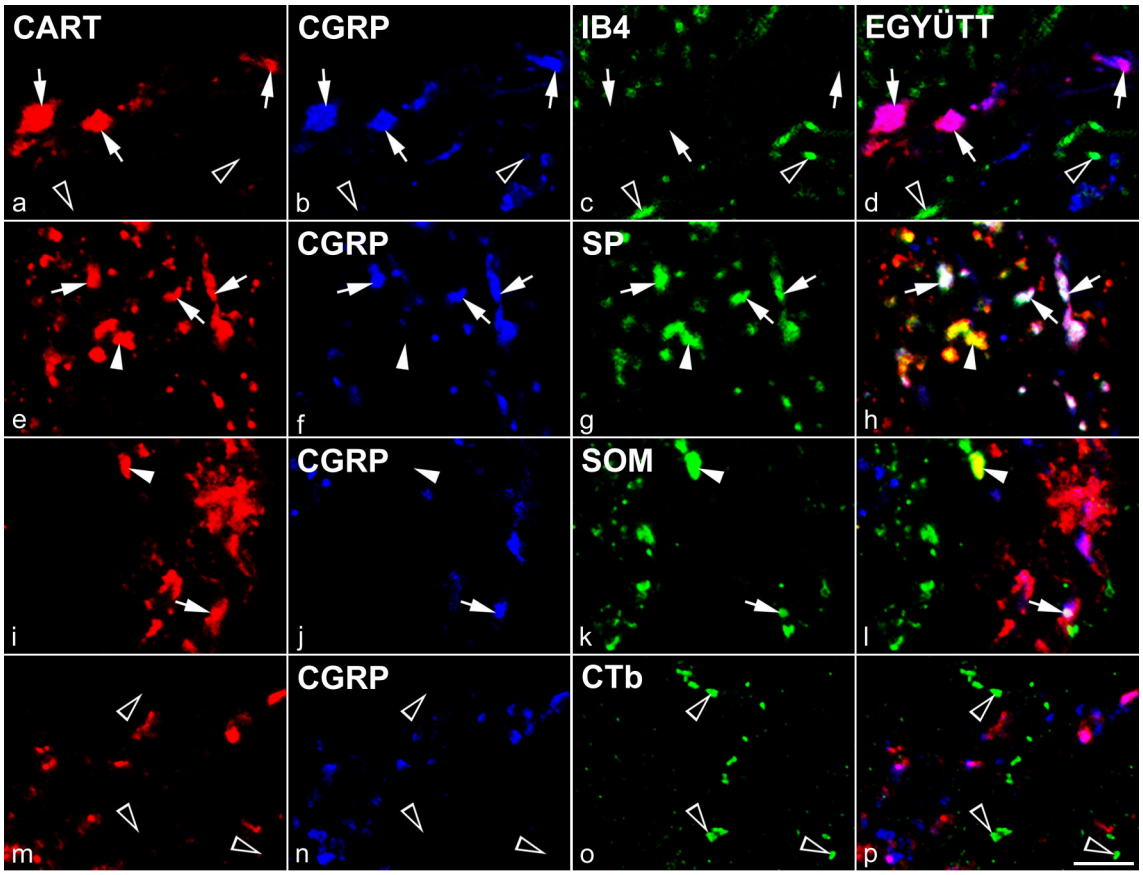
A CART peptid megoszlását a patkány gerincvelő teljes hosszában vizsgáltuk. Megfigyeléseink összhangban vannak a korábbi, patkányban csak egyes gerincvelő-szegmentumokat érintő (Dun és mtsai, 2000; Koylu és mtsai, 1998) vagy az egér gerincvelőre vonatkozó leírásokkal (Ohsawa és mtsai, 2000). A CART festődést a cervicalistól a sacralis szegmentumokig lehetett követni: a CART-immunreaktív rostok és terminálisok végig megtalálhatók voltak valamennyi laminában és a dorsolateralis kötegben, beleértve a lateralis spinalis magot is. A legintenzívebb CART festődést a gerincvelő felületes lamináiban, de legfőképpen a lamina I-ben láttuk, s a mélyebb laminák felé haladva a CART immunreaktivitás drasztikusan csökkent. Kisszámú CART-pozitív sejtet lehetett megfigyelni a canalis centralis körül, míg a hátsó szarvban csupán egy-egy halványan jelölődött sejtet láttunk. A korábbi megfigyeléseknek megfelelően (Koylu és mtsai, 1998; Ohsawa és mtsai, 2000) erősen festődő sejtek és rostok voltak láthatók a thoracalis szakaszon az intermediolateralis oszlopban is (16. ábra).



16. ábra. A CART-immunreaktív struktúrák megoszlása a patkány gerincvelő cervicalis (C), thoracalis (Th), lumbalis (L) és sacralis (S) szegmentumaiban. A legintenzívebb CART jelölődés a hátsó szarv felületes lamináiban, a canalis centralis körül és a thoracalis szelvények intermediolateralis oszlopában látható. Mérték: 0,5 mm.

5.2. A CART peptid kolokalizációja primer afferens, interneuron és leszálló pálya markerekkel

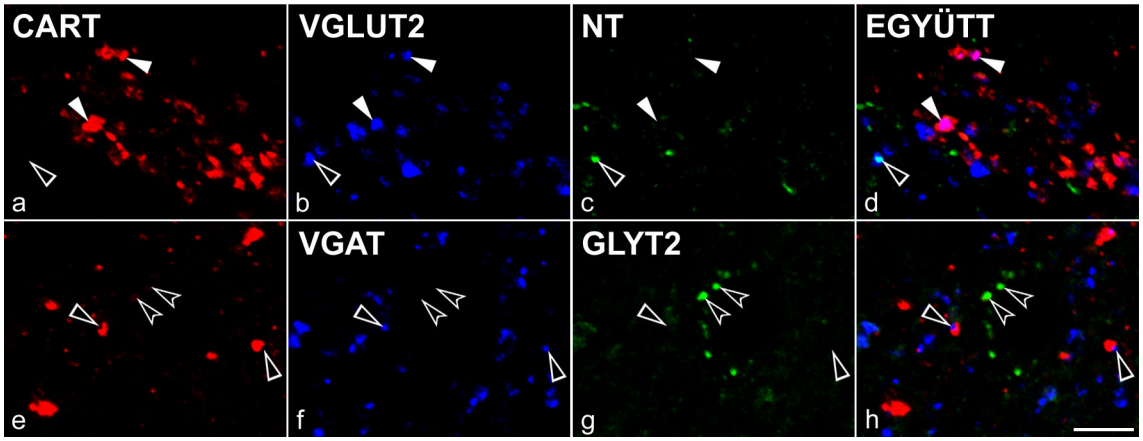
A lamina I-ben a CART-pozitív axonok többsége (72,6%), míg a lamina II-ben kisebb hányada (34,8%) volt CGRP-immunreaktív (17. ábra, a-p). A CART terminálisok 62,7%-a, ill. 33,9%-a tartalmazott egyidejűleg CGRP-t és SP-t is a lamina I-ben, ill II-ben. (17. ábra, e-h). Csak kevés CART-erg végződés exprimálta egyszerre a CGRP-t és szomatosztatint (9,9% a lamina I-ben és 0,9% a lamina II területén; 17. ábra, i-l). Az IB4-kötődés alapján azonosított nem-peptiderg primer afferens terminálisokban CART-ot nem találtunk (17. ábra, a-d).



17. ábra: CART immunreaktivitás a patkány gerincvelő felületes lamináiban végződő primer afferensekben és interneuronalis axonokban. Egy sorban ugyanazon terület egyetlen optikai síkot megjelenítő felvételei láthatók lézervonalanként, ill. együttesen. A CART-immunreaktív terminálisok túlnyomó része tartalmazza a peptiderg primer afferensek markerét, a CGRP-t (a-p; nyilak). A nem-peptiderg C-rostok markerével, az IB4-gyel nem találtunk kolokalizációt (a-d; üres nyílhegyek). A peptiderg C-rostok többsége SP-t (e-h; nyilak), egy kisebb populációja pedig SOM-t tartalmaz (i-l; nyilak). A SP, ill. a SOM az interneuronalis eredetű CART-erg végződésekben is jelen van (e-l; nyílhegyek). A CART-immunpozitív terminálisok nem jelölődnek CTb-vel (m-p; üres nyílhegyek). Mérték: 5 µm.

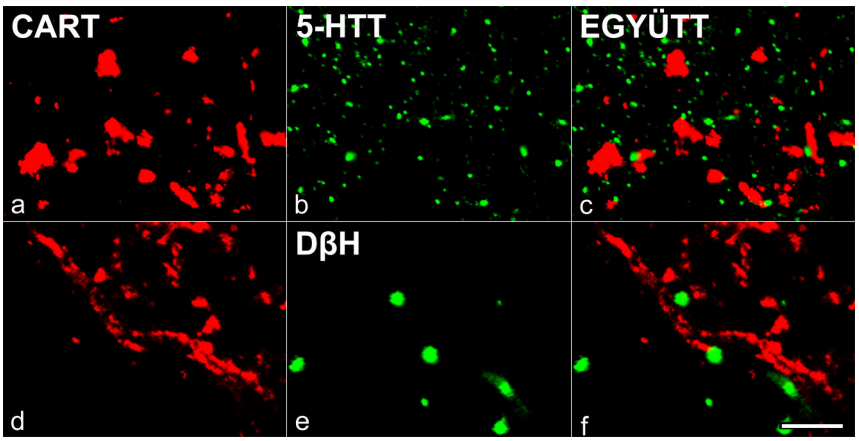
A nervus ischiadicusba adott CTb hasonló megoszlásban jelölte a gerincvelőben végződő velőhüvelyes rostokat (a felületes laminákban kizárólag az Aδ rostokat), mint ahogy arról korábban mások beszámoltak (LaMotte és mtsai, 1991; Rivero-Melian és Grant, 1991; Woolf és mtsai, 1995): a CTb-vel jelölt rostok láthatók voltak a lamina I-ben és a lamina II ventralis felétől a lamina V-ig, de a festődés hiányzott a lamina II dorsalis feléből. A CTb és a CART között nem találtunk kolokalizációt (17. ábra, m-p).

A CART-immunreaktív terminálisok mintegy fele (57,2% a lamina I és 48,8% a lamina II területén) tartalmazta a VGLUT2 glutamát transzportert (18. ábra, a-d). A gátló interneuron markerekkel történő kolokalizáció vizsgálatakor azt találtuk, hogy a CART-erg végződések nagyon kis hányada exprimálta csupán a VGAT GABA transzportert (2,4% és 6,6% a lamina I-ben, ill. II-ben), míg a GLYT2 glicin transzporterrel nem láttunk kolokalizációt (18. ábra, e-h). A CART peptidet és VGLUT2-t egyaránt tartalmazó, de CGRP-t nem exprimáló, serkentő interneuronokhoz tartozó terminálisok 17,1%-a és 33,9%-a volt SP-pozitív a lamina I-ben, ill. II-ben, valamint 15,3%-a és 25,5%-a volt szomatosztatin-immunreaktív a lamina I, ill. II területén. A neurotenzin-jelölt CART-erg terminálisok száma elenyésző volt (3,2% és 3,4 % a lamina I-ben, ill. II-ben; 18. ábra, a-d).



18. ábra: CART immunreaktivitás a serkentő és gátló interneuronalis végződésekben a patkány gerincvelő felületes lamináinak területén. Egy sorban ugyanazon terület egyetlen optikai síkot megjelenítő felvételei láthatók lézervonalanként, ill. együttesen. A CART-immunreaktív végződések egy része VGLUT2-t tartalmaz (a-d; nyílhegyek). A serkentő interneuonok egy csoportjára jellemző NT-nel a kolokalizáció elenyésző mértékű (a-d; üres nyílhegy), és hiányzik a gátló interneuronok által exprimált VGAT és GLYT2 esetében (e-h; üres és homorú nyílhegyek). Mérték: 5 μm.

Megfigyeléseink szerint a felületes laminákban a CART peptid nem kolokalizált a leszálló pályákra jellemző markerekkel: sem az 5-HTT szerotonin transzporterrel, sem a noradrenerg végződésekben megtalálható dopamin-β-hidroxilázzal (19. ábra). A CART peptid kolokalizációját a különféle primer afferens, lokális interneuron és leszálló pálya markerekkel a 2. táblázat foglalja össze.

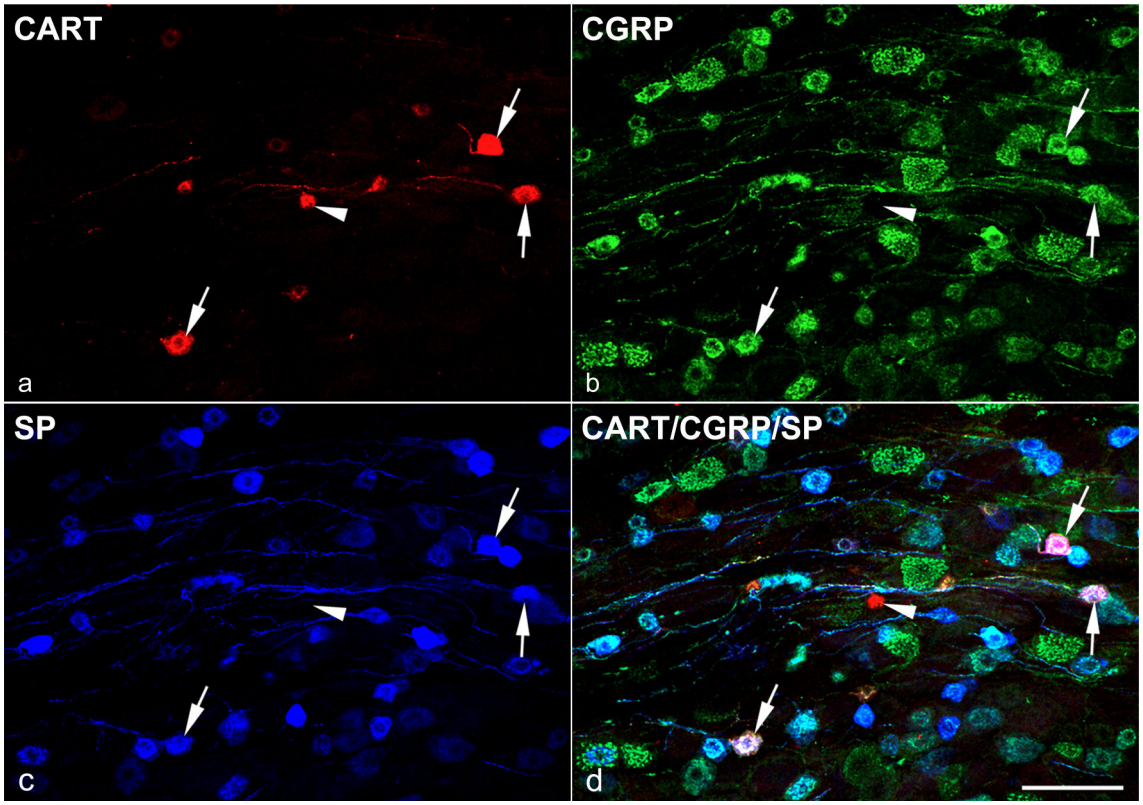


19. ábra: CART immunreaktivitás és leszálló pálya markerek a patkány gerincvelő felületes lamináiban. Egy sorban ugyanazon terület egyetlen optikai síkot megjelenítő felvételei láthatók lézervonalanként, ill. együttesen. A CART-immunreaktív végződések egyik leszálló pálya markert sem tartalmazzák. Mérték: 5 µm.

2. táblázat: A CART peptid kolokalizációja primer afferens, interneuron és leszálló pálya markerekkel a lamina I-II-ben. Minden értéket %, átlag±szórás alakban adtunk meg. A kolokalizáció relatív gyakoriságát a következőképpen értékeltük: -: <5%, +: 5-20%, ++: 21-50%, +++: >50%.

	Markerek	Lamina I		Lamina II	
Primer afferensek					
Peptiderg afferensek					
Substance P-tartalmú	CGRP+, SP+	+++	62,7±0,9	++	33,9±1,3
Szomatosztatin-tartalmú	CGRP+, SOM+	+	9,9±1,2	-	0,9±0,3
Nem-peptiderg C afferensek	CGRP-, IB4+	-	0	-	0
Aδ nociceptív afferensek	CTb+	-	0	-	0
Glutamáterg primer afferens és interneuronalis végződések	VGLUT2+	+++	57,2±4,3	++	48,8±8,4
Interneuronalis végződések					
substance P-tartalmú	CGRP-, SP+	+	17,1±0,1	++	33,9±2,7
szomatosztatin-tartalmú	CGRP-, SOM+	+	15,3±1,8	++	25,5±1,4
neurotenzin-tartalmú	NT+	-	3,2±0,5	-	3,4±0,2
GABA-erg	VGAT+	-	2,4±0,4	+	6,5±1,7
glicinerg	GLYT2+	-	0	-	0
Leszálló axonok					
szerotoninerg	5-HTT+	-	0	-	0
noradrenerg	DβH+	-	0	-	0

A spinalis gangionokból készült metszetekben kevés (10% alatti) CART peptidet exprimáló sejtet és rostot láttunk. A CART-pozitív sejtek a kis sejtek közé tartoztak, és többségükben CGRP-t és SP-t is tartalmaztak. Ugyanakkor találtunk olyan idegsejteket is, melyekben a CART mellett sem a CGRP, sem a SP nem volt jelen (20. ábra).

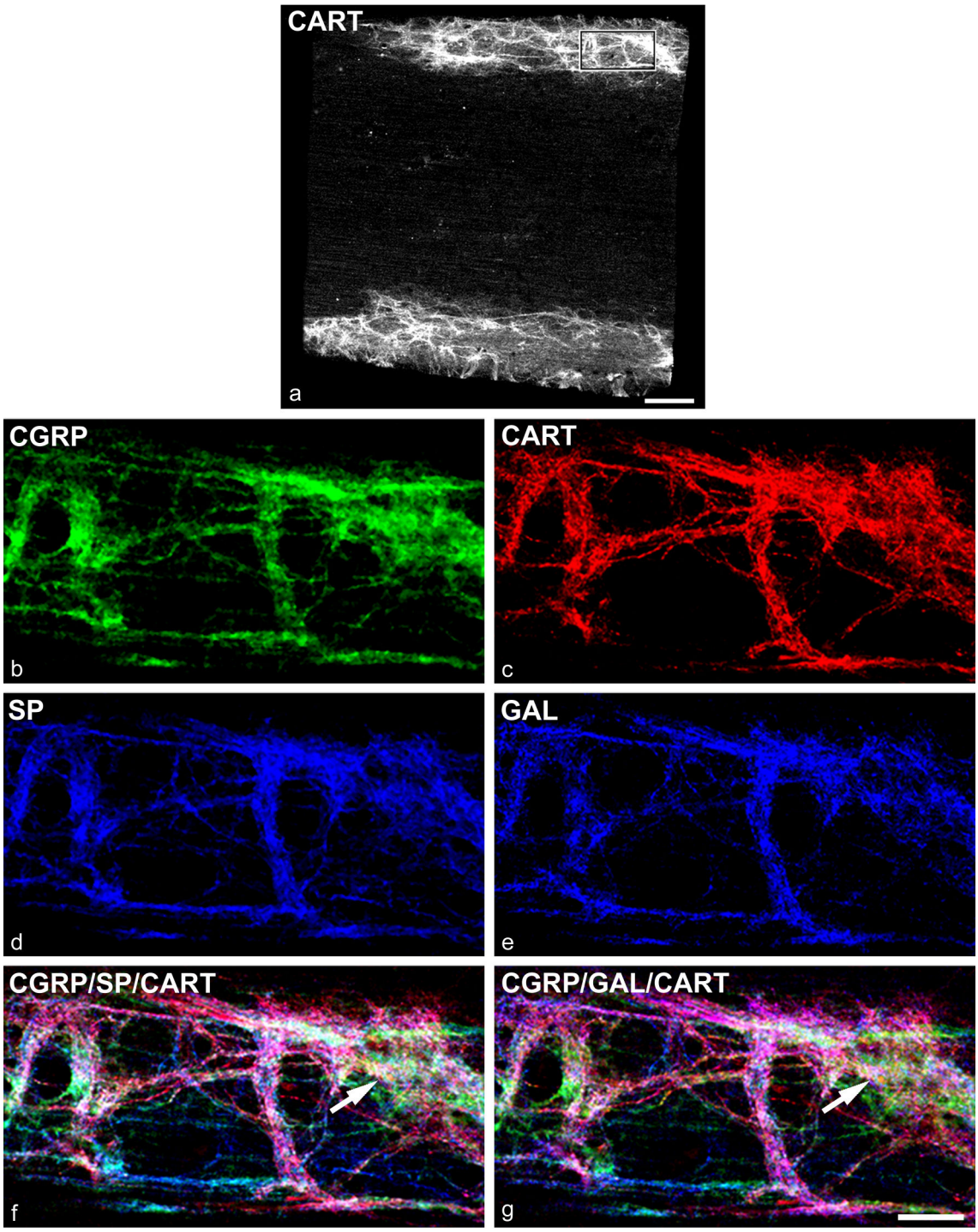


20. ábra: CART peptid a spinalis ganglionokban. a) CART, b) CGRP, ill. c) SP immunfestés lézervonalanként, ill. d) a három csatorna egyesített képe. A CART-ot a kissejtek exprimálják, többnyire CGRP-vel és SP-vel együtt (nyilak), de előfordulnak csak CART-ot tartalmazó neuronok is (nyílhegy). Mérték: 100 µm.

5.3. A CART peptid előfordulási gyakorisága a primer afferensekben. A CART és a galanin kolokalizációja a lamina I-ben

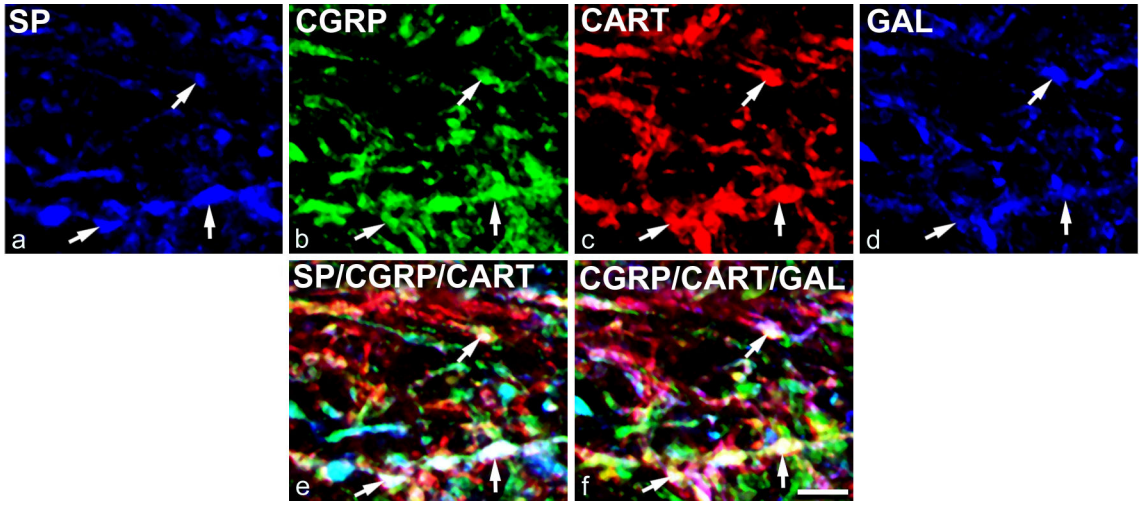
A horizontális gerincvelő metszetekben a lamina I területén a CART-erg végződések többsége (79,7%) exprimálta a CGRP-t. Ez az adat összhangban van korábbi eredményeinkkel, melyek a gerincvelő keresztmetszetein végzett analízisekből származnak (Kozsurek és mtsai, 2007). A lamina I véletlenszerűen kiválasztott CGRP-immunreaktív terminálisai csaknem mindegyike SP-pozitív is volt (97,9%) és a CART

peptid a CGRP/SP-immunpozitív végződések 49,0%-ában volt jelen (21. és 22. ábra, 3. táblázat).



21. ábra: A patkány gerincvelő horizontális metszete négyes immunfluoreszcens jelöléssel. a) A CART-erg rostok erősen festődő fonatot képeznek a lamina I területén. Az a) képen bekeretezett terület kis nagyítású képei lézervonalanként b)-e), ill. együttesen f)-g). A nyíllal jelölt terület nagy nagyítású képe a 22. ábrán látható. Mérték: a) 250 µm és b)-g) 50 µm.

A lamina I területén a CGRP/SP-tartalmú boutonok többsége (81,4%) galanin-pozitív volt és a CGRP/SP/galanin-immunreaktív terminálisok mintegy fele (51,5%) tartalmazta a CART peptidet. A CART-ot és CGRP-t együttesen exprimáló boutonok jórésze (72,9%) galanin-pozitívnak bizonyult, míg a CART-immunreaktív terminálisoknak csak kis hányada (8,6%) volt galanin-pozitív és egyidejűleg CGRP-negatív (3. táblázat).

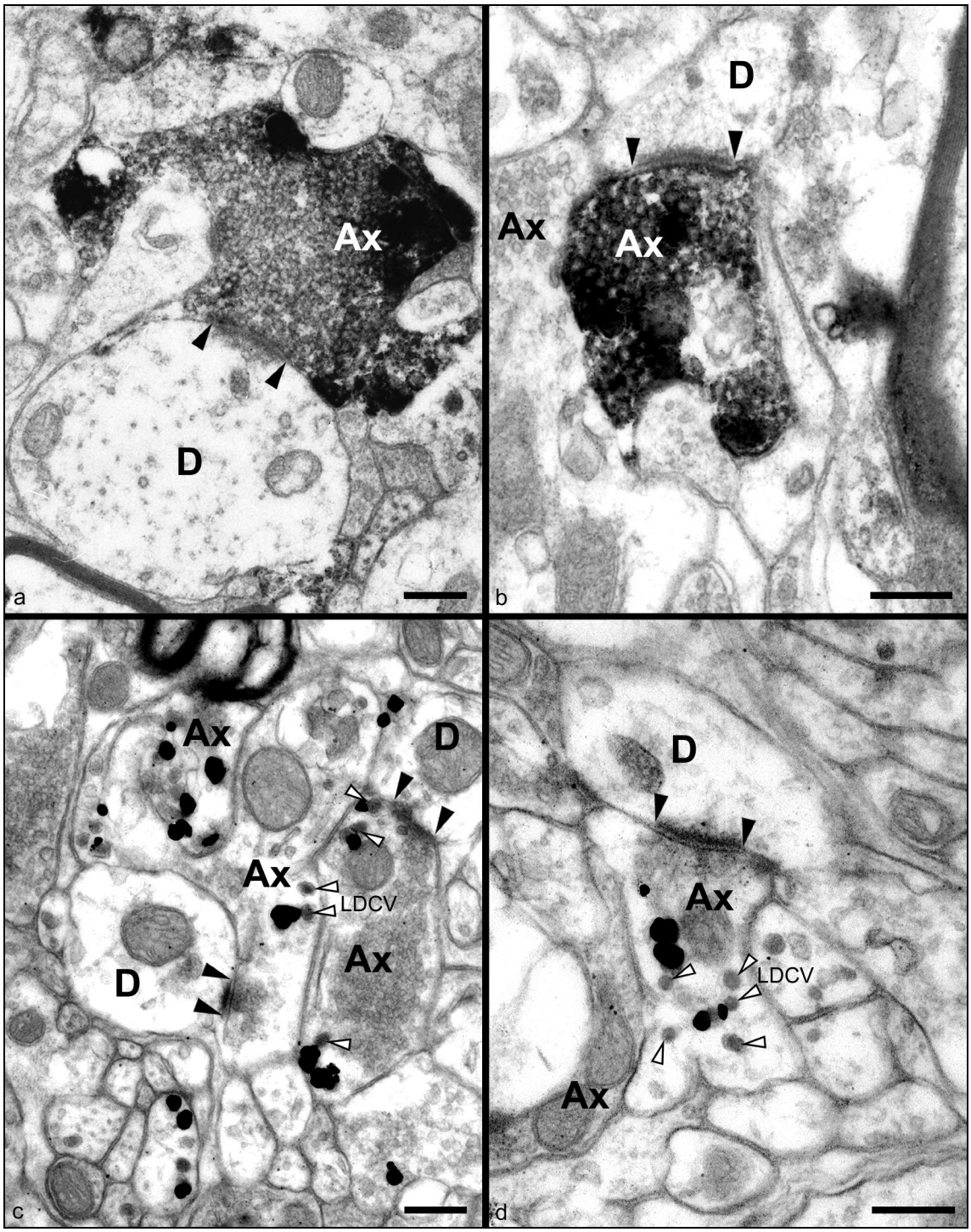


22. ábra: A lamina I horizontális metszetben négyes immunfluoreszcens jelöléssel. (A 21. ábrán nyíllal jelölt terület nagy nagyítású képe.) Az a)-d) képeken a SP-, CGRP-, CART- és GAL-immunfestés látható lézervonalanként, egyetlen konfokális optikai síkban. Az e) képet az a)-c), az f) képet pedig a b)-d) képek összevetítésével nyertük. A nyilak a négy peptidet együttesen tartalmazó boutonokra mutatnak. Mérték: 5 µm.

3. táblázat: A CART és a galanin előfordulási gyakorisága a peptiderg primer afferensekben és a két peptid kolokalizációjának mértéke a lamina I terminálisaiban

Peptiderg (CGRP-t exprimáló) primer afferens végződések neuropeptid tartalma a lamina I-ben	Átlag, %	Standard hiba
CGRP+	2,1	0,5
CGRP+ / SP+	11,4	0,9
CGRP+ / SP+ / CART+	7,0	1,5
CGRP+ / SP+ / GAL+	39,1	1,6
CGRP+ / SP+ / CART+ / GAL+	41,5	0,6
CART-erg végződések a lamina I-ben	**Átlag, %**	**Standard hiba**
CART+ / CGRP+ / GAL+	58,1	4,0
CART+ / CGRP+ / GAL-	21,6	7,4
CART+ / CGRP- / GAL+	8,6	1,9
CART+ / CGRP- / GAL-	11,8	3,9

5.4. Elektronmikroszkópos vizsgálatok



23. ábra: CART-immunreaktív axonvégződések elektronmikroszkópos felvételeken. A CART peptidet a)-b) DAB kromogén reakcióval vagy c)-d) ezüst-intenzifikált arany technikával tettük láthatóvá. A jelölt axonok (Ax) aszimmetrikus szinapszist (nyílhegyek) létesítenek dendritekkel (D). A jelölt axonok szoros összefekvést mutatnak más jelölt vagy jelöletlen axonokkal. LDCV: nagy, ún. „dense core" vezikulák (large dense core vesicles; üres nyílhegyek). Mérték: 250 nm.

A CART-immunreaktív terminálisok elektronmikroszkópos szintű vizsgálatára két módszert is alkalmaztunk. A CART-tartalmú axonvégződések szinaptikus kapcsolatainak tanulmányozása érdekében ultravékony sorozatmetszetekben metódusonként 25-30 boutont követtünk végig.

A DAB reakció esetén az antitestek jó penetrációja lehetővé tette, hogy az egyes jelölt terminálisokat számos ultravékony sorozatmetszeten keresztül követhessük. A CART-erg axonok túlnyomó többsége (25-ből 24) aszimmetrikus szinapszissal végződött valamely neuron dendritjén, ill somáján. Mivel a DAB csapadék a jelölt végződéseket gyakorlatilag teljesen kitöltötte, a CART-pozitív axonok viszonyát más jelölt vagy jelöletlen axonokkal nem lehetett megállapítani (23. ábra, a-b) Ennek kiküszöbölésére alkalmaztuk az *ezüst-intenzifikált arany* technikát, amelynél az aranyszemcsék sokkal diszkrétebb megjelenésűek, mint a DAB csapadék, s nem fedik el a jelölt axonok ultrastruktúráját (23. ábra, c-d). Viszont a szekunder antitest a hozzá kötött kolloidális arany miatt viszonylag rosszul penetrál, s csak néhány sorozatmetszeten át biztosítja a jelölt terminális követését. Harmincból tíz jelölt terminális aszimmetrikus szinapszissal végződött valamely dendriten, a többi jelölt axonvégződés szorosan feküdt hozzá más jelölt vagy jelöletlen axonhoz, de axo-axonalis szinapszist nem láttunk közöttük.

5.5. CART peptid tartalmú végződések a lamina I projekciós neuronjain

Valamennyi vizsgált lamina I projekciós neuronon végződtek primer afferens (CART+/CGRP+) és lokális interneuron eredetű (CART+/CGRP-) terminálisok (24., 25. és 26. ábra). A CART+ (beleértve a CGRP+ és CGRP- boutonokat is), a CART+/CGRP+ és CART-/CGRP+ végződések neuronfelszínre számított sűrűségét (bouton/1000 μm^2), a minimum és maximum értékeket, valamint az értékek átlagát és standard hibáját a 4. táblázat foglalja össze a projekciós neuronok neurokémiai és morfológiai típusai szerinti bontásban.

A CART-erg boutonok denzitása az NK1R-t exprimáló projekciós neuronokon 5,3 és 69,6 között változott (átlag: 21,0), az NK1R-negatív sejteken 8,1 és 48,6 között mozgott (átlag: 21,7). A CART-ot és CGRP-t együttesen tartalmazó terminálisok

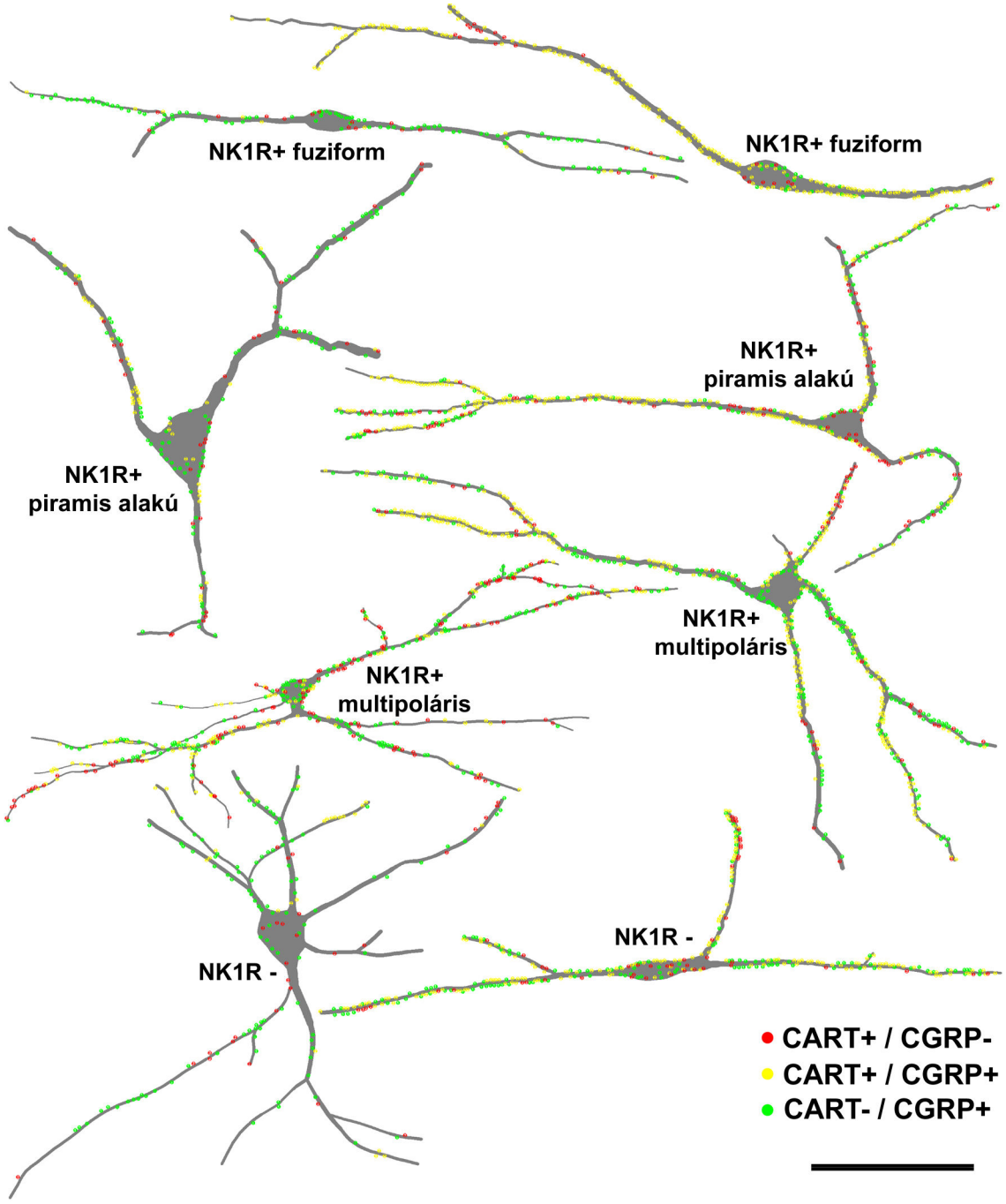
sejtfelszíni sűrűsége az NK1R-es projekciós neuronokon 1,7 és 60,1 között (átlag: 13,4), a nem NK1R-es sejteken 4,3 és 26,7 között változott (átlag: 11,8). A denzitáskülönbség az NK1R-pozitív és NK1R-negatív projekciós sejtek között sem a CART-os, sem a CART/CGRP-s boutonok vonatkozásában nem volt szignifikáns (Mann-Whitney teszt, p=0,425 a CART-erg terminálisok esetében és p=0,382 a CART/CGRP-pozitív boutonokra vonatkozóan).

A NK1R-pozitív fuziform neuronokon a CART-tartalmú terminálisok sejtfelszínre számolt sűrűsége 5,3 és 53,7 között (átlag: 20,1), az NK1R-pozitív piramis alakú sejteken 6,7 és 69,6 között (átlag: 24,7), az NK1-pozitív multipoláris neuronokon pedig 6,4 és 58,8 között (átlag: 17,9) volt. A CART-erg boutonok vonatkozásában a denzitásbeli különbség az NK1R-t exprimáló lamina I projekciós sejtek három morfológiai altípusa között nem volt szignifikáns (Kruskal-Wallis teszt, p=0,276). A CART-ot és CGRP-t együttesen tartalmazó boutonok denzitása az NK1R-pozitív projekciós sejtek fuziform, piramis alakú és multipoláris sejttípusai esetében a következőképp alkult: 3,0-45,6 (átlag: 12,1), 1,7-60,1 (átlag: 18,6) és 3,1-48,6 (átlag: 9,9). A denzitásbeli különbség az NK1R-t exprimáló lamina I projekciós sejtek három morfológiai altípusa között a CART/CGRP-pozitív terminálisok vonatkozásában sem volt szignifikáns (Kruskal-Wallis teszt, p=0,109).

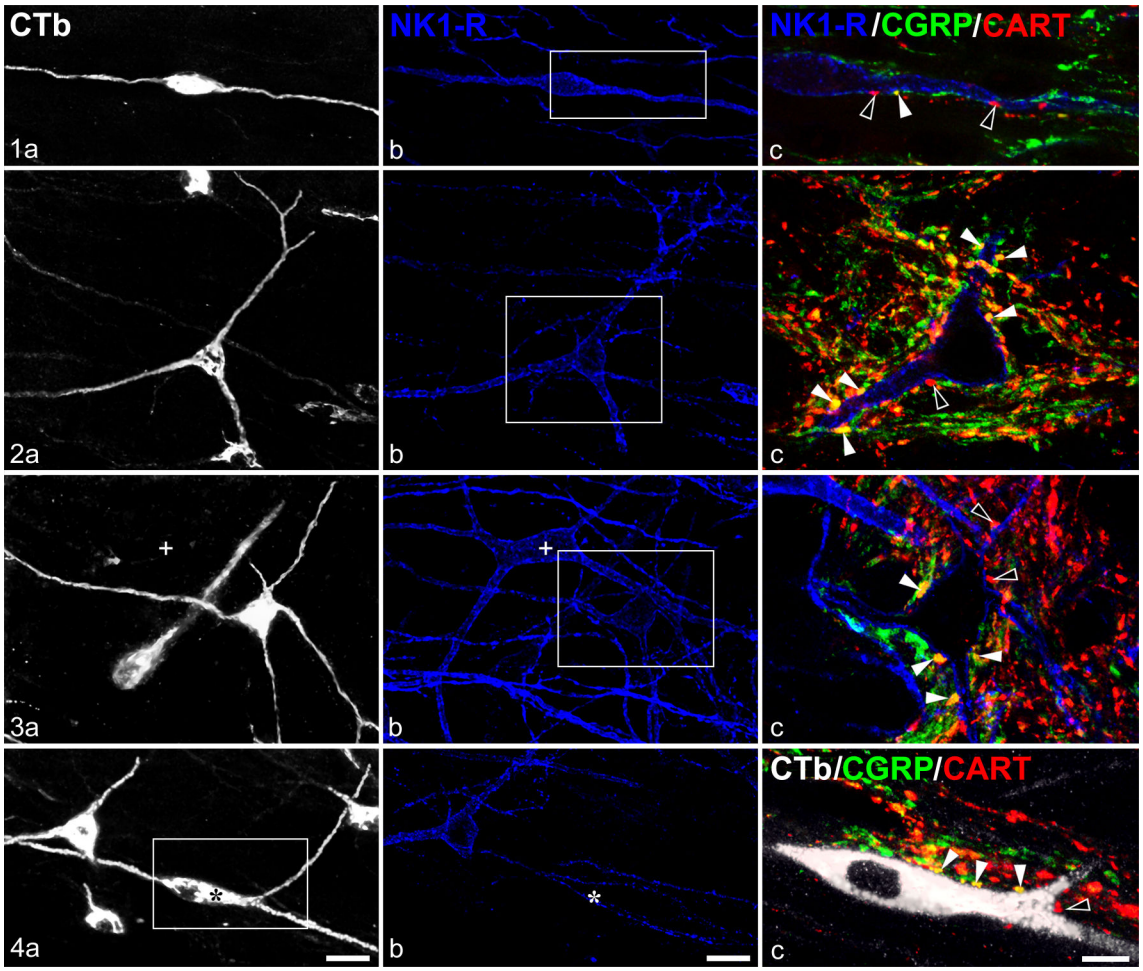
Összességében elmondhatjuk hogy az NK1R-t exprimáló fuziform, piramis alakú és mutlipoláris sejteken, valamint az NK1R-negatív projekciós neuronokon végződő CART-erg terminálisok 32,3-89,0%-a (átlag: 51,4%), 7,3-88,7%-a (átlag: 57,8%), 23,2-82,7%-a (átlag: 42,6%), ill. 45,7-76,0%-a (átlag: 57,9%) volt egyidejűleg CGRP-immunreaktív is.

A CART-negatív de CGRP-pozitív boutonok denzitását is meghatároztuk a spinoparabrachialis projekciós neuronok különböző neurokémiai és morfológiai csoportjain. A bouton denzitás az NK1-pozitív, ill. NK1R-negatív sejteken 1,6 és 43,2 között (átlag: 23,6), ill. 5,6 és 21,0 (átlag: 12,8) között változott. A denzitás az NK1R-t nem exprimáló projekciós sejteken szignifikánsan alacsonyabb volt (Student-féle t-teszt; p=0,003). Az NK1R-pozitív projekciós sejtek három morfológiai altípusánál a denzitásértékek a következőképpen alakultak: a fuziform sejteknél 11,7-39,2 (átlag: 23,3), a piramissejteknél 1,6-42,8 (átlag: 23,2), végül a multipoláris neuronoknál 7,2-43,2 (átlag: 24,0). Az NK1R-pozitív sejtek egyes altípusai között mért

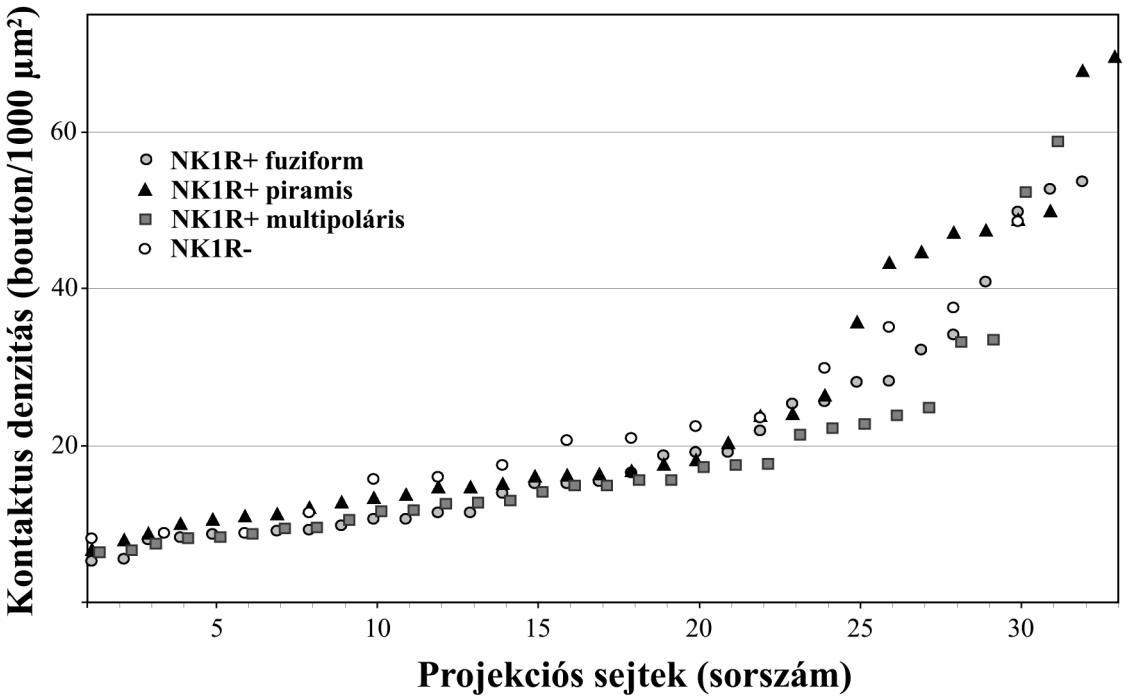
denzitáskülönbségek nem bizonyultak statisztikailag szignifikánsnak (ANOVA; p=0,960).



24. ábra: Néhány retrográd jelölt lamina I projekciós neuron sémás rajza. Az NK1R-pozitív fuziform, piramis alakú és multipoláris, valamint az NK1R-t nem exprimáló sejtekre egyaránt láthatunk példát. A balra látható sejteken alacsonyabb, a jobb oldalon lévő sejteken magasabb a CART-erg teminálisok felületegységre számított denzitása. Minden színes pont egy-egy a sejt felszínével szorosan összefekvő boutont jelöl. A CART+/CGRP- terminálisok piros, a CART+/CGRP+ végződések sárga, a CART-/CGRP+ boutonok zöld színűek. Mérték: 100 µm.



25. ábra: CART-erg végződések a lamina I projekciós sejtek különböző neurokémiai és morfológiai altípusain. A lamina I projekciós sejtjeit a LPb-be injektált CTb retrográd úton jelöli (1-4. a, fehér). A projekciós neuronok többségét az NK1-receptor immunfestés körülrajzolja (1-3. b, kék). Az NK1-receptort exprimáló sejtek esetében a fuziform (1), piramis alakú (2) és multipoláris (3) sejtekre látunk példát. A bekeretezett területek kinagyított, hármas immunfloureszcens festéssel jelölt felvételein (1-4. c) láthatók a projekciós sejteken végződő CART-ot tartalmazó (piros, üres nyílhegyek), ill. CART-ot és CGRP-t koexprimáló (sárga, telt nyílhegyek) terminálisok. +: NK1-receptort exprimáló, CTb-negatív sejt (lokális interneuron); *: NK1-receptort nem exprimáló CTb-pozitív (projekciós) sejt. Az a)-b) képek 15-20db szomszédos, 1µm-es lépésközzel rögzített konfokális optikai metszet projekciójával készültek, míg a c) ábrákat 3-5db, 0,5µm-es lépéssel fényképezett optikai sík összevetítésével kaptuk. Mérték: 20µm (a-b), 10µm (c).



26. ábra: A CART-erg terminálisok felületegységre számított sűrűsége a projekciós sejtek különböző morfológiai és neurokémiai alcsoportjain. Az egyes csoportokon belül a sejteket a denzitásétrékek szerint növekvő sorrendbe raktuk (X-tengely), s a sejtekhez tartozó denzitásokat ábrázoltuk (Y-tengely). A legnagyobb denzitásértékeket a piramis alakú sejtek esetében kaptuk, de a különbség statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak.

4. táblázat: A CART-erg (CART+/CGRP+ és CART+/CGRP- együttesen), a CART/CGRP-tartalmú (CART+/CGRP+) és a CGRP-t CART nélkül exprimáló (CART-/CGRP+) végződések sejtfelszíni denzitása a lamina I projekciós neuronok különböző neurokémiai és morfológiai altípusain

	CART+ terminálisok denzitása (átlag ±SEM; min.-max.; bouton/1000 µm²)	**CART+/CGRP+ terminálisok denzitása** (átlag ±SEM; min.-max.; bouton/1000 µm²)	**CART-/CGRP+ terminálisok denzitása** (átlag ±SEM; min.-max.; bouton/1000 µm²)
NK1R-pozitív sejtek	21,0 ±1,5 5,3 – 69,6	13,4 ±1,9 1,7 – 60,1	23,6 ±1,4 1,6 – 43,2
fuziform	20,1 ±2,4 5,2 – 53,7	12,1 ±3,4 3,0 – 45,6	23,3 ±2,2 11,7 – 39,2
piramis alakú	24,7 ±3,1 6,7 – 69,6	18,6 ±4,0 1,7 – 60,1	23,2 ±2,6 1,6 – 42,8
multipoláris	17,9 ±2,2 6,4 – 58,8	9,9 ±2,5 3,1 – 48,6	24,0 ±2,3 7,2 – 43,2
NK1R-negatív neuronok	21,7 ±3,0 8,1 – 48,6	11,8 ±2,4 4,3 – 26,7	12,8 ±1,6 5,6 – 21,0

6. Megbeszélés

6.1. Módszertani megjegyzések

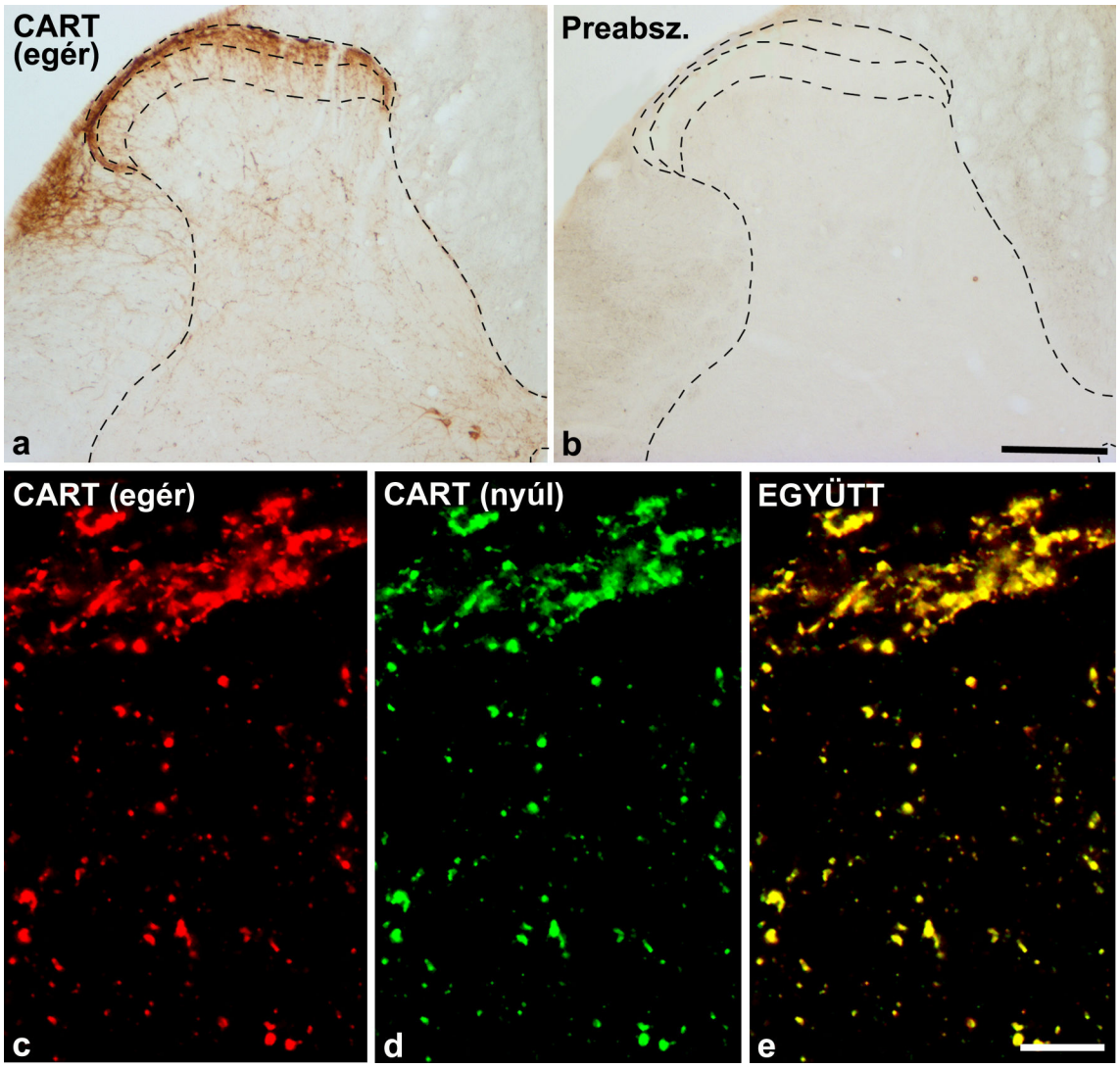
Az általunk használt CART antitestekkel a legjobb jelölődést akkor kaptuk, amikor a 4%-os paraformaldehid oldathoz 4% akroleint is adtunk. Tapasztalataink szerint az akrolein nem befolyásolta az antitestek viselkedését: a spinalis ganglionban és a gerincvelőben ugyanazt a festődési mintázatot láttuk, mint amit mások korábban a hagyományosnak mondható 4%-os paraformaldehidet tartalmazó fixálószer esetében leírtak (Ch'ng és mtsai, 1985; Koylu és mtsai, 1998; Ohsawa és mtsai, 2000; Todd és Spike, 1993). Meg kell jegyezzük azt is, hogy az akrolein 4%-os koncentrációban már befolyásolta CTb, mint transganglionaris vagy retrográd jelölőanyag immunhisztokémiai kimutathatóságát, így azokban a kísérletekben, melyekben a CTb-t a nervus ischiadicusba vagy a lateralis parabrachialis areába injektáltuk, a fixáló akrolein koncentrációját 1%-ra csökkentettük. A CART antitestek 1% akrolein mellett is következetes és megbízható jelölődést eredményeztek.

A monoklonális CART antitestet Jes Thorn Clausen és munkatársai egérben termelték, az immunizáláshoz tisztított, rekombináns CART(54-102) peptidet használtak (Thim és mtsai, 1998; Vrang és mtsai, 1999a). Az antitestet előállító kutatócsoport vizsgálatai szerint az ellenanyag azonos mértékben kötődött a CART(54-102), CART(61-102) és a CART(62-102) fragmentumokhoz (Singru és mtsai, 2007).

A poliklonális CART antitestet Michal J. Kuhar és munkatársai CART(79-102) peptiddel immunizált nyúlból nyerték. Vizsgálataik szerint az antitest kötődött az immunizáló peptidhez, de nem ismert fel olyan más fragmentumokat mint a CART(2-27), CART(31-52) és a CART(55-76) fehérjéket (Koylu és mtsai, 1997).

A két, kereskedelmi forgalomban nem beszerezhető CART-antitestet előttünk több kutatócsoport is használta, specificitásukat publikációikban többszörösen igazolták (Fekete és mtsai, 2000; Koylu és mtsai, 1997; 1998; Kozsurek és mtsai, 2007; Menyhert és mtsai, 2007; Singru és mtsai, 2007; Smith és mtsai, 1999; Vrang és mtsai, 1999a; Wittmann és mtsai, 2004). Az antitestek specificitásának megerősítése céljából mi is végeztünk további vizsgálatokat. Amikor az egérben termelt antitestet a természetben előforduló, egyik legjelentősebb, biológiailag aktív CART-fragmenttel, a CART(55-

102)-vel (American Peptide Company; 0,01 mM) egy éjszakán át preabszorbeáltuk, az immunperoxidáz reakció során a gerincvelő felületes lamináiban a jellegzetes festődés teljesen hiányzott. Ezen túlmenően a nyúlban és egérben termelt CART-antitestek a kettős immunfluoreszcens reakció során ugyanazon struktúrákat jelölték (27. ábra).



27. ábra: Az immunhisztokémiai vizsgálatokban használt egér és nyúl CART-antitestek specificitásának vizsgálata. a) Az egérben termelt CART antitesttel végzett immunperoxidáz reakció és b) az immunperoxidáz jelölődés hiánya az ellenanyag CART(55-102) peptiddel történt preabszorbciója után. A gerincvelő felszínes lamináinak konfokális mikroszkóppal készült, egyetlen optikai síkot megjelenítő képein látható, hogy az egérben (c, piros) és a nyúlban (d, zöld) termelt CART-antitestek azonos struktúrákat festenek, az átfedés (e, sárga) gyakorlatilag teljes. Mértékek: a)-b) 250 µm, ill. c)-e) 5 µm.

Pályajelöléses vizsgálatokkal igazolták, hogy a lamina I-ben elhelyezkedő projekciós sejtjek fő végződési területe a caudalis ventrolateralis medulla, az LPb és a periaqueductalis szürkeállomány patkányban, macskában és majomban egyaránt (Cechetto és mtsai, 1985; Craig, 1995; Hylden és mtsai, 1989; Lima és Coimbra, 1988; Lima és mtsai, 1991; Menetrey és mtsai, 1982). A caudalis ventrolateralis medullába vagy az LPb-be adott retrográd tracerrel az ellenoldali lumbalis gerincvelőben a lamina I projekciós neuronok mintegy 85%-át lehet jelölni (Spike és mtsai, 2003). Mivel a LPb a fájdalmat és hőingereket illetően is közvetlen bemenettel rendelkezik a lamina I projekciós neuronjai felől (Bester és mtsai, 2000; Craig és Kniffki, 1985), a CTb-t ebbe a régióba injektáltuk. A beadási hely kiterjedése és a retrográd jelölt sejtek száma hasonló volt ahhoz, amit korábban mások publikáltak (Almarestani és mtsai, 2007; Spike és mtsai, 2003).

6.2. A CART-immunreaktív végződések a lamina I-II területén

Leírtuk, hogy a lamina I-ben végződő CART-erg terminálisok többsége, ill. a lamina II területén egy kisebb hányada CGRP-t tartalmaz. Általánosan elfogadott, hogy a CGRP a gerincvelő hátsó szarvában kizárólag primer afferensekben van jelen, s nem exprimálják hátsó szarvi interneuronok, így a myelinhüvely nélküli peptiderg (C) rostok markerének tekinthető (Carlton és mtsai, 1987; Ju és mtsai, 1987). Ezzel összhangban CART-pozitív sejteket – zömében kisméretű, s így feltehetően a nociceptív információ továbbításban érintett neuronokat – találtunk a spinalis ganglionokban. Ugyanakkor a CART tartalmú sejtek nagyon alacsony aránya (a kisméretű sejtek kevesebb mint 10%-a volt CART-immunreaktív) látszólag nehezen egyeztethető össze a gerincvelő felületes lamináiban látható CART-erg terminálisok magas számával. A magyarázatot a galaninnál korábban feltételezett mechanizmus szolgáltathatja: valószínűleg jóval több neuron exprimálja a CART peptidet a ganglion spinalében, mint amennyi az immunfluoreszcens festéssel kimutatható, de a peptid axonalis transzportja a hátsó szarvi végződések irányába feltehetően olyan gyors, hogy a sejttestekben a CART mennyisége a kimutathatóság szintje alatt marad (Zhang és mtsai, 1993). Ugyanez a mechanizmus magyarázhatja azt, miért csak néhány CART-pozitív idegsejt látható a gerincvelő hátsó szarvában, amikor a lamina I, de főleg a lamina II területén a lokális

interneuronokhoz tartozó (CGRP-t nem tartalmazó) CART-erg végződések jelentős mennyiségben vannak jelen.

Méréseink szerint a lamina I-ben a CART-pozitív rostok mintegy 30%-a lokális interneuron eredetű, és csaknem 60%-a tartalmazza a VGLUT2-t. Korábbi publikációkból ismert, hogy a VGLUT2 elsősorban a serkentő interneuronok terminálisaiban van jelen, de néhány peptiderg primer afferens is mutat gyenge VGLUT2 immunreaktivitást (Alvarez és mtsai, 2004; Landry és mtsai, 2004; Li és mtsai, 2003; Oliveira és mtsai, 2003; Todd és mtsai, 2003). Az analízisek során mi nem tettünk különbséget gyenge és erős VGLUT2 immunpozitivitás között, és ez magyarázhatja, hogy a lamina I-ben a vártnál magasabb a VGLUT-2-t exprimáló CART-erg terminálisok aránya.

Míg a lamina I-ben a CART-pozitív rostok többnyire primer afferens eredetűek, a lamina II területén a CART peptid sokkal inkább lokális interneuron markerekkel kolokalizál. A serkentő interneuronok által exprimált VGLUT2-t a lamina II CART-erg rostjainak mintegy felében találtuk meg, ugyanakkor más, serkentő interneuron markerek együttesen a CART peptidet tartalmazó végződések 60%-ában (SP+/CGRP-: 34%, SOM+/CGRP-: 25% és NT+: 3%) voltak jelen. Ismert, hogy a szomatosztatin- és a neurotenzin-tartalmú hátsó szarvi interneuronok két különálló populációt képeznek (Proudlock és mtsai, 1993; Todd és Koerber, 2005), és azt is tudjuk, hogy mind a SP-, mind a szomatosztatin-, mind a neurotenzin-tartalmú interneuronalis terminálisok exprimálják a VGLUT2-t (Todd és mtsai, 2003), s végül általánosan elfogadott, hogy a SP- és szomatosztatin-tartalmú primer afferensek két különböző populációt alkotnak (Hokfelt és mtsai, 1976). Tuchscherer és Seybold (1989) vizsgálatai szerint a SP és a szomatosztatin nem kolokalizál a gerincvelő hátsó szarvában, de velük ellentétben mi azt láttuk, hogy a CGRP-t nem tartalmazó terminálisok egy kis hányada egyaránt exprimálja a SP-t és a szomatosztatint. Az általunk használt két antitest a gyártó által végzett radioimmunoassay vizsgálatok szerint nem ad keresztreakciót. A két megfigyelés közti ellentétet magyarázhatja az eltérő fixálószer használata vagy az a tény, hogy Tuchscherer és Seybold (1989) fluoreszcens feltéttel rendelkező konvencionális mikroszkópot használt, míg mi a z-tengely mentén sokkal jobb felbontást biztosító konfokális mikroszkópot. Összességében azt mondhatjuk tehát, hogy míg a SP- és szomatosztatin-tartalmú rostok a primer afferensek két különálló

populációját alkotják (Hokfelt és mtsai, 1976), addig a két neuropeptid az interneuronok egy kis hányadában kolokalizál egymással. A SP-t, ill. szomatosztatint exprimáló interneuronok közötti részleges átfedést figyelembe véve a fenti ellentmondás feloldható.

Fiziológiai kísérletekben a CART potencírozza az NMDA-, de érdemben nem befolyásolja az AMPA-glutamáterg transzmissziót (Hsun Lin és mtsai, 2005). A SP-, szomatosztatin-, ill. neurotenzin-tartalmú serkentő (glutamáterg) interneuronok pontos funkciója még nem ismert, de közülük azok, melyek a CART peptidet is exprimálják, a CART-erg primer afferensekkel együtt szerepet játszhatnak az NMDA-receptorok által mediált élettani folyamatokban, beleértve a fájdalomérzést is. Az a tény, hogy a SP és/vagy a szomatosztatin mind a CART-tartalmú primer afferensekben, mind a CART-erg interneuronokban megtalálható azt sugallja, hogy a CART nem csak a glutamáterg transzmisszióra, de a SP és a szomatosztatin felszabadulására és hatására is befolyást gyakorolhat.

6.3. CART peptid a primer afferensekben

A primer afferensek elsődleges neurotranszmittere a glutamát (Alvarez és mtsai, 2004; Broman és mtsai, 1993; De Biasi és Rustioni, 1988; Nagy és mtsai, 2004), de számos neuropeptid is előfordulhat ezekben a rostokban. A peptiderg primer afferensek túlnyomó többsége CGRP tartalmaz. A lamina I-ben és II_o-ben együttesen, ill. a lamina II_i-ben végződő CGRP-pozitív rostok 50%-ában, ill. 33%-ában a SP is jelen van (Tuchscherer és Seybold, 1989). A gerincvelőbe belépő peptiderg primer afferensek a lamina I-ben rostrocaudalis és mediolateralis irányokban futó fonatokat képeznek (21. ábra). Éppen ezért analíziseinket az L3-L5 szegmentumok horizontális metszetein végeztük, s azt találtuk, hogy csaknem minden (98%) CGRP-immunreaktív végződés SP-t is tartalmazott, és a CART peptid a CGRP/SP-pozitív boutonok mintegy felében (49%) volt jelen. Vizsgálataink szerint a SP a CGRP tartalmú primer afferensek nagyobb hányadában található meg a lamina I-ben, mint ahogy az Tuchscherer és Seybold publikációjában szerepel. Ez azt sugallja, hogy a lamina I és a lamina II_o területén végződő CGRP-immunreaktív rostok más-más szubpopulációhoz tartoznak. Az eltérés abból is származhat, hogy Tuchscherer és Seybold keresztmetszeteken, mi

pedig horizontális metszeteken végeztük az analíziseket, amely ugyancsak befolyásolhatja a kapott eredményeket.

Fiziológiai kísérletek szerint minden SP-t tartalmazó primer afferens nociceptív információt szállít (Kellstein és mtsai, 1990; Lawson és mtsai, 1997). Eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy a lamina I-ben szinte minden CGRP-immunpozitív afferens nociceptív, s a CART peptid ezek mintegy 50%-ában van jelen.

Ismert, hogy a SP-tartalmú primer afferensek egy alcsoportja exprimálja a μ-opioid- (MOR-1) receptort, amelyen a morfin, származékai és analógjai is hatnak (Li és mtsai, 1998). Damaj és munkatársai (2004) szerint a CART peptid jelentősen potencírozza a morfin hatását. Elképzelhető, hogy a SP/CART-tartalmú végződésekből felszabaduló CART peptid valamilyen módon hatékonyabbá teszi a preszinaptikus MOR1-receptorokhoz kapcsolódó jelátviteli mechanizmusokat. A preszinaptikus MOR1-receptorokról tudjuk, hogy ligandkötés esetén Ca^{2+}-csatornákat zárnak, ezáltal fékezik a neurotranszmitter felszabaduláshoz szükséges kálcium-influxot (Abbadie és mtsai, 2001). Mindezek következménye a primer afferens terminálisokban lévő glutamát, illetve nociceptív peptidek felszabadulásának gátlása lehet. A hipotézis igazolásához azonban további vizsgálatok szükségesek.

6.4. CART peptid és a galanin együttes előfordulása

A akut és krónikus fájdalomban szerepet játszó fehérjék közül talán a galanint tanulmányozták a legtöbbet (Brumovsky és mtsai, 2006; Carlton és Coggeshall, 1996; Colvin és mtsai, 1997; Coronel és mtsai, 2008; Dahlin és mtsai, 2003; Hokfelt és mtsai, 1987; Holmes és mtsai, 2003; Kerr és mtsai, 2000; Kerr és mtsai, 2001; Liu és Hokfelt, 2002; Ma és Bisby, 1997; Villar és mtsai, 1989; Villar és mtsai, 1991; Wiesenfeld-Hallin és mtsai, 2005; Zhang és mtsai, 1995b). A funkcionális vizsgálatok a galanin és a CART peptid közötti érdekes párhuzamokra hívták fel a figyelmet. A galanin intrathecalis injekciója is hyperalgesiát okoz (Kuraishi és mtsai, 1991), a galanin is fokozza a morfin analgéziás hatását, valamint modulálja az NMDA-receptoron keresztül történő glutamáterg neurotranszmissziót (Hua és mtsai, 2004). Vizsgálataink szerint a lamina I-ben a CGRP/SP-immunreaktív terminálisok 81%-a tartalmaz galanint, és 52%-ukban a CART peptid is jelen van. Továbbá a CART/CGRP-immunpozitív terminálisok

73%-a egyidejűleg galaninerg is. Ismert, hogy a hátsó szarvi GABA-erg interneuronok egy része galanint is tartalmaz (Simmons és mtsai, 1995; Zhang és mtsai, 1995b). Korábban leírtuk, hogy a CART-erg terminálisok mintegy 3, ill. 7%-a VGAT-pozitív a lamina I-ben, ill. II-ben (Kozsurek és mtsai, 2007). Ezért feltételezhetjük, hogy azok a CART/galanin-immunreaktív rostok, melyek nem tartalmaznak CGRP-t, lokális gátló interneuronokból származnak.

Megfigyeléseink szerint tehát, a CART-, ill. galanin-tartalmú nociceptív peptiderg afferensek között jelentős átfedés van, ami a két peptid között akár pre-, akár posztszinaptikus interakciót tesz lehetővé mind akut, mind krónikus fájdalom esetén.

6.5. A lamina I projekciós sejtek CART-erg innervációja

A lamina I neuronjainak tanulmányozásakor szükségszerűen találkozunk egy hosszú ideje megválaszolatlan kérdéssel a morfológia és funkció kapcsolatának vonatkozásában. Macskákon végzett kombinált fiziológiai-morfológiai vizsgálatok azt mutatták, hogy a lamina I fuziform alakú sejtjei nociceptív specifikusak, a multipoláris sejtek polimodális nociceptívek, míg a piramis alakúak csak nem-nociceptív hideg ingerekre válaszolnak. Ezt látszott alátámasztani az a tény, hogy majmokban az NK1R-t exprimáló neuronok többségét fuziformnak vagy multipolárisnak találták, míg a piramis alakú sejteknek csak nagyon kis hányada volt NK1R-pozitív. Ezek alapján feltételezték, hogy a piramis alakú sejtek nem nociceptívek (Han és mtsai, 1998; Yu és mtsai, 1999). A patkányból származó adatok ebből a szempontból ellentmondásosak: egyes vizsgálatok arról számoltak be, hogy a piramis alakú spinothalamicus (Yu és mtsai, 2005), ill. a spinoparabrachialis (Almarestani és mtsai, 2007) projekciós neuronok közül nagyon kevesen exprimálják az NK1R-t, míg mások szerint a caudalis ventrolateralis medulla vagy a LPb felől retrográd jelölt piramis alakú sejtek mintegy 80%-a NK1R-pozitív (Spike és mtsai, 2003).

A lamina I projekciós neuronok analízise során az NK1R-pozitív sejtek felszínén szignifikánsan nagyobb SP denzitást írtak le, mint az NK1R-negatív neuronok esetében, ugyanakkor az NK1R-pozitív sejtek három morfológiai altípusa között a különbség statisztikailag elhanyagolható volt (Todd és mtsai, 2002). Meg kell jegyezzük azt is, hogy fájdalmas hő-, ill. kémiai ingerlést követően az NK1R-pozitív

fuziform, piramis alakú és multipoláris projekciós sejtek a Fos expresszió szempontjából hasonlóan viselkedtek (Todd és mtsai, 2002; Todd és mtsai, 2005). A fentiek alapján valószínű, hogy a majommal ellentétben patkányban a piramis alakú lamina I projekciós sejtek is exprimálják az NK1R-t és válaszolni képesek nociceptív ingerekre. Kísérleteinkben nem volt célunk annak meghatározása, hogy az LPb felől jelölt NK1R-immunreaktív lamina I projekciós sejtek mekkora hányada sorolható a fuziform, piramis alakú, ill. multipoláris csoportba, de az egyes altípusok közel azonos gyakorisággal fordultak elő, nem volt olyan morfológiai kategória, mely esetében nehezebb lett volna összegyűjteni az előre meghatározott sejtszámot, s az NK1R-negatív sejtek között sem volt feltűnően magas a piramis alakú sejtek aránya. Majmokban és macskákban a lamina I spinothalamicus projekciós neuronjai a gerincvelő hosszában inhomogén eloszlást mutatnak: a cervicalis és lumbalis intumescentiának megfelelően dominálnak a piramis alakú és multipoláris sejtek, míg thoracalisan nagyobb a fuziform neuronok előfordulási gyakorisága. Bár hasonló megfigyelések patkányban nem állnak rendelkezésünkre, a szegmentális különbségek jelenlétét nem lehet kizárni. Yu és munkatársai (2005), valamint Almarestani és munkatársai (2007) a spinothalamicus, ill. spinoparabrachialis sejteket Sprague-Dawley patkányok L4-L6 szegmentumaiban vizsgálták, míg Andrew J. Todd munkacsoportja és mi Wistar patkányok L1-L5 szelvényein végeztük az analíziseket. Mindent összevetve patkányban az ellentmondásokat a használt állattörzsek és a vizsgált szegmentumok eltérő volta oldhatja fel.

Megfigyeléseink szerint minden spinoparabrachialis neuronon végződnek CART, ill. CART/CGRP-tartalmú rostok. Analíziseink szerint a CART-erg, ill. CART/CGRP-erg terminálisok sűrűsége a projekciós neuronok minden altípusában igen tág határok között ingadozik, és a legmagasabb bouton denzitásokat a piramis alakú sejteken figyeltük meg. Az analízisek szerint a CART-erg, ill a CART/CGRP-erg boutonok denzitása hasonló volt az NK1R-pozitív, ill. NK1R-negatív neuronokon, és a bouton denzitást az NK1R-immunreaktív fuziform, piramis alakú és multipoláris projekciós neuronokon összehasonlítva sem volt a különbség szignifikáns. Ugyanakkor az NK1R-t exprimáló spinoparabrachiális neuronokon egyértelműen magasabb volt a CART-ot nem tartalmazó CGRP-pozitív végződések denzitása, mint az NK1R-negatív sejteken, de az NK1R-pozitív csoport fuziform, piramis alakú és multipoláris típusai

között nem volt szignifikáns eltérés. Ezek a megfigyelések jól korrelálnak a Todd és munkatársai által publikáltakkal (Todd és mtsai, 2002): a CGRP/SP-tartalmú terminálisok denzitása szignifikánsan magasabb az NK1R-t exprimáló lamina I projekciós neuronokon, mint az NK1R-negatív sejteken, viszont az NK1R-pozitív sejtek morfológiai altípusai közt nincs különbség.

Mindezek alapján feltételezhető, hogy a CGRP/SP-tartalmú nociceptív primer afferenseknek legalább két – nagy valószínűséggel funkcionálisan is különböző – szubpopulációja létezik: a CART-ot nem tartalmazó típus preferálja az NK1R-immunpozitív projekciós sejteket az NK1R-t nem exprimálókkal szemben, míg a CART-tartalmú CGRP/SP rostok nem szelektíven végződnek a lamina I NK1R-pozitív és NK1R-negatív spinoparabrachialis neuronjain.

6.6. Szinaptikus kapcsolatok

A CGRP/SP-tartalmú peptiderg primer afferensek ritkán vesznek részt a felületes laminák szinaptikus glomerulusainak (Rethelyi és Szentagothai, 1969; Szentagothai, 1964) képzésében, többségükben egyszerű terminálisokkal végződnek. (Alvarez és mtsai, 1993; Carlton és mtsai, 1987; Ribeiro-da-Silva és mtsai, 1989). Egyik meghatározó jellemzőjük, hogy végződéseikben a kerek kis vezikulák mellett nagy, ún. “dense core” vezikulák is megtalálhatók. (Alvarez és mtsai, 1993; Carlton és mtsai, 1987; DiFiglia és mtsai, 1982; Hiura és mtsai, 1998). Ezek az axonok főleg dendritekkel létesítenek szinaptikus kapcsolatot, de a lamina I és II területén az axoszomatikus kapcsolatok sem ritkák (Alvarez és mtsai, 1993; Carlton és mtsai, 1987; DiFiglia és mtsai, 1982; Hayes és Carlton, 1992; Hiura és mtsai, 1998; Ribeiro-da-Silva, 1995).

Spike és munkatársai a CGRP/SP-tartalmú primer afferensek egy sajátos altípusát írták le. Ezek a rostok endomorfint tartalmaznak, mely a MOR-1 receptor endogén ligandja. Bár a lamina II-ben a MOR1-t exprimáló, NK1R-negatív neuronokhoz szorosan fekszenek hozzá, elektronmikroszkóppal szinapszisok jelenlétét nem sikerült igazolni (Spike és mtsai, 2003). Ebből arra következtethetünk, hogy ezekben az esetekben nem a glutamát vagy a SP által közvetített excitáció az elsődlleges hatás, hanem a felszabaduló endomorfin által kiváltott nem-szinaptikus gátlás.

Vizsgálataink szerint a CART-immunreaktív axonvégződések többsége aszimmetrikus szinapszist létesít dendriteken vagy ritkábban szómákon, s a terminálisok többségében a primer afferensekre jellemző “dense core” vezikulák is megfigyelhetőek. Leírtuk, hogy a lamina I projekciós neuronjain CART- és CART/CGRP-pozitív terminálisok végződnek. Valószínűsíthető, hogy ezek a projekciós sejtek a CART-erg axonok egyik lehetséges posztszinaptikus targetjei. Ezt az elképzelést támasztják alá a Todd és munkatársai által publikáltak: a lamina I NK1R-pozitív projekciós sejtjein vizsgált CGRP/SP-immunpozitív terminálisok mintegy 80%-a esetében sikerült elektronmikroszkóppal szinapszis jelenlétét igazolni (Todd és mtsai, 2002).

Eredményeink szerint a CART tartalmú afferensek egyszerre tartalmaznak glutamátot, CGRP-t, SP-t, és galanint, számos pre- és posztszinaptikus mechanizmus érvényesülhet a primer afferensek és a lamina I projekciós sejtjei közti kapcsolatokban.

7. Következtetések

Kutatási eredményeink a CART peptid gerincvelői szintű nociceptív információfeldolgozásban betöltött szerepének anatómiai alapjait képezik:

(1) a CART peptid nagy mennyiségben van jelen a gerincvelő teljes hosszában a hátsó szarv felületes lamináiban, melyek a fájdalmas ingerek feldolgozásának kiemelt jelentőségű területei;

(2) A CART a lamina I területén végződő CGRP/SP-tartalmú, s ezért nociceptívnek tartott peptiderg C primer afferensek egy jelentős részében megtalálható;

(3) a CART jelentős mértékű kolokalizációt mutat a galaninnal, melyet a krónikus fájdalom szindrómákban az egyik legfontosabb szerepet játszó peptidnek tartanak;

(4) a CART-eg rostok közvetlenül végződnek a lamina I projekciós neuronjain, melyek többségükben nociceptív információt továbbítanak a supraspinalis területek felé.

További vizsgálatok szükségesek annak megválaszolására, hogy az NMDA-glutamáterg transzmissziót potencírozó CART peptid képes-e befolyásolni a lamina I neuronjain kialakuló LTP-t, s így szerepe lehet-e a krónikus fájdalom kialakulásában vagy fenntartásában. Ugyancsak indokolt annak tanulmányozása, milyen módon lép interakcióba a CART a napjainkban leghatékonyabbnak tartott fájdalomcsillapítókkal, az ópiátokkal. A CART nocicepcióban betöltött szerepének tisztázásához nagymértékben járulna hozzá, ha sikerülne receptorát vagy receptorait azonosítani. A későbbiekben pedig a receptoron ható szelektív vegyületek önmagukban vagy a ma ismert analgetikumokkal kombinálva hozzájárulhatnak a fájdalom hatékonyabb terápiájához.

8. Összefoglalás

A kokain- és amfetamin-regulált transzkript (CART) peptid számos élettani folyamat szabályozásában játszik szerepet: többek között hatással van a jutalmazó-megerősítő rendszerre, a táplálékfelvétel szabályozására és egyes endokrin működésekre. A CART peptid szerepét a gerincvelői szintű fájdalomérzékelésben viselkedési vizsgálatok valószínűsítették, de a viselkedési tesztek eredményeinek anatómiai alapjai teljességgel hiányoztak. A hátsó szarv felületes lamináiban, amelyek a nociceptív információfeldolgozás kiemelten fontos területei, sűrű CART-immunreaktív rosthálózatot írtak le, de ismeretlen volt, miként illeszkedik a CART peptid a gerincvelő fájdalmas stimulusokat feldolgozó és továbbító neuronhálózatainak működésébe.

Annak érdekében, hogy a patkány gerincvelő felületes lamináiban végződő CART-erg rostok eredetét meghatározzuk, többes immunfluoreszcens festéseket végeztünk CART ellenes antitesttel és a primer afferensekre, serkentő és gátló interneuronokra, valamint a leszálló pályákra jellemző különböző neurokémiai markerekkel. A kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP), mely a peptiderg primer afferensek markere, a lamina I, ill. II területén végződő CART-immunreaktív terminálisok 72,6%, ill. 34,8%-ában volt jelen. Ezen rostok többsége P-anyagot (SP) is tartalmazott. A lamina I-II-ben a CART-pozitív végződések egy másik csoportjában a CGRP nem volt kimutatható, de ezek SP vagy szomatosztatin mellett vezikuláris glutamát transzporter 2-t exprimáltak, mely elsősorban a serkentő interneuronok axonvégződéseiben van jelen. A lamina I területén a CGRP-immunpozitív terminálisok mintegy fele tartalmazott CART peptidet, és a CGRP/CART-erg végződések jó részében a galanin – a krónikus fájdalom szindrómák egyik kulcsfehérjéje – is megfigyelhető volt. Elektronmikroszkópos vizsgálataink szerint a CART-immunreaktív terminálisok főleg aszimmetrikus szinapszisokat hoztak létre a felületes laminák neuronjaival, ill. azok dendritjeivel. Retrográd pályajelölés és többes fluoreszcens immunhisztokémia együttes alkalmazásával vizsgáltuk a CART- és/vagy CGRP-immunpozitív terminálisok kapcsolatát a lamina I spinoparabrachialis projekciós neuronjaival, melyek többsége a fájdalmas stimulusokat továbbítja a supraspinalis struktúrák irányába. A vizsgált projekciós sejtek mindegyike fogadott CART-, ill. CART/CGRP-tartalmú axonvégződéseket. A sejtfelszínre vonatkozatatott terminális

sűrűség a projekciós neuronok egyetlen morfológiai vagy neurokémiai alcsoportja esetében sem mutatott szignifikáns különbséget.

Eredményeink szerint a hátsó szarv felületes lamináiban látható CART-immunreaktív rostok többsége nociceptív primer afferens, egy kisebb csoportja pedig lokális interneuron eredetű. A CART és a nociceptív peptidek együttes előfordulása a primer afferensekben, ill. lokális interneuronokban azt sugallja, hogy a CART hatással lehet a glutamáterg neurotranszmisszióra, valamint befolyásolhatja a CGRP, SP, galanin, ill. szomatosztatin felszabadulását és hatását a nociceptív információfeldolgozás komplex folyamataiban. Megfigyeléseink szerint a CGRP/SP-tartalmú primer afferensek CART-erg alcsoportja közvetlenül innerválja a lamina I spinoparabrachialis neuronjait attól függetlenül, hogy azok mely neurokémiai vagy morfológiai altípushoz tartoznak.

Mindezek az adatok a CART peptid gerincvelői szintű nociceptív információfeldolgozásban betöltött szerepének anatómiai alapjait képezik.

9. Summary

Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide has been implicated in regulation of several physiological functions including reward, food-intake and neuroendocrine functions. The role of CART peptide in spinal nociception has been suggested by behavioural studies and dense plexus of CART-immunoreactive fibres has been described in the superficial laminae of the spinal cord, which are key areas of the pain transmission, but the anatomical evidence for the involvement of CART peptide in the spinal nociception has been completely missing.

We used antibody against CART peptide, together with markers for various types of primary afferents, interneurons and descending systems to determine the origin of the CART-immunoreactive axons in the superficial laminae of the rat spinal cord. Calcitonin gene-related peptide (CGRP), a marker for peptidergic primary afferents in the dorsal horn, was present in 72.6% and 34.8% of CART-immunoreactive axons in lamina I and II, respectively. The majority of these fibres also contained substance P (SP). The other subpopulation of CART-immunoreactive boutons in laminae I-II also expressed SP and/or somatostatin without CGRP, but contained vesicular glutamate transporter 2, which is present mainly in excitatory interneuronal terminals. In lamina I, CART peptide was present in half of the CGRP-immunoreactive terminals and many of the CART/CGRP-ergic boutons were also immunoreactive for galanin, which is one of the key peptides in chronic pain states. Electron microscopy showed that most of the CART terminals formed asymmetrical synapses mainly with dendrites. Using retrograde tract tracing and multiple immunofluorescent labelling, the relationship between CART and/or CGRP axons and projection neurons, playing a pivotal role in forwarding painful stimuli toward supraspinal levels, were examined. The contact density analysis of CART-ergic and/or CGRP-containing fibres terminating on lamina I spinoparabrachial projection neurons showed that all examined cells received contacts, but the innervation density did not differ significantly between either of the different neurochemical or the morphological subclasses of these cells.

Our data demonstrate that the majority of CART-immunoreactive axons in the spinal dorsal horn originate from peptidergic nociceptive primary afferents, while a smaller proportion of them arises from local interneurons. The co-existence of CART

with nociceptive peptides in primary afferents and excitatory interneurons suggests that the peptide can affect glutamatergic neurotransmission as well as the release and effects of SP, somatostatin and galanin in nociception and other sensory processes. Furthermore, we revealed a direct non-selective input from CART-immunoreactive axons to lamina I projection neurons.

These results provide anatomical bases for involvement of CART peptide in spinal pain transmission.

10. Irodalomjegyzék

Abbadie C, Pasternak GW, Aicher SA. (2001) Presynaptic localization of the carboxy-terminus epitopes of the mu opioid receptor splice variants MOR-1C and MOR-1D in the superficial laminae of the rat spinal cord. *Neuroscience*, 106:833-842.

Adams JC. (1992) Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *J Histochem Cytochem*, 40:1457-1463.

Adams LD, Gong W, Vechia SD, Hunter RG, Kuhar MJ. (1999) CART: from gene to function. *Brain Res*, 848:137-140.

Ali Z, Wu G, Kozlov A, Barasi S. (1996) The role of 5HT3 in nociceptive processing in the rat spinal cord: results from behavioural and electrophysiological studies. *Neurosci Lett*, 208:203-207.

Almarestani L, Waters SM, Krause JE, Bennett GJ, Ribeiro-da-Silva A. (2007) Morphological characterization of spinal cord dorsal horn lamina I neurons projecting to the parabrachial nucleus in the rat. *J Comp Neurol*, 504:287-297.

Alvarez FJ, Morris HR, Priestley JV. (1991) Sub-populations of smaller diameter trigeminal primary afferent neurons defined by expression of calcitonin gene-related peptide and the cell surface oligosaccharide recognized by monoclonal antibody LA4. *J Neurocytol*, 20:716-731.

Alvarez FJ, Kavookjian AM, Light AR. (1993) Ultrastructural morphology, synaptic relationships, and CGRP immunoreactivity of physiologically identified C-fiber terminals in the monkey spinal cord. *J Comp Neurol*, 329:472-490.

Alvarez FJ, Villalba RM, Zerda R, Schneider SP. (2004) Vesicular glutamate transporters in the spinal cord, with special reference to sensory primary afferent synapses. *J Comp Neurol*, 472:257-280.

Antal M, Polgar E, Chalmers J, Minson JB, Llewellyn-Smith I, Heizmann CW, Somogyi P. (1991) Different populations of parvalbumin- and calbindin-D28k-immunoreactive neurons contain GABA and accumulate 3H-D-aspartate in the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Comp Neurol*, 314:114-124.

Barr ML, Kiernan JA. *The Human Nervous System. An Anatomical Viewpoint.* 5. kiadás, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, 1988.

Bessou P, Perl ER. (1969) Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *J Neurophysiol*, 32:1025-1043.

Bester H, Chapman V, Besson JM, Bernard JF. (2000) Physiological properties of the lamina I spinoparabrachial neurons in the rat. *J Neurophysiol*, 83:2239-2259.

Bhave G, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RWt. (2002) cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron*, 35:721-731.

Bhave G, Hu HJ, Glauner KS, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RWt. (2003) Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100:12480-12485.

Bik W, Skwarlo-Sonta K, Szelagiewicz J, Wolinska-Witort E, Chmielowska M, Martynska L, Baranowska-Bik A, Baranowska B. (2008) Involvement of the cocaine-amphetamine regulated transcript peptide (CART 55-102) in the modulation of rat immune cell activity. *Neuro Endocrinol Lett*, 29:359-365.

Bleakman D, Alt A, Nisenbaum ES. (2006) Glutamate receptors and pain. *Semin Cell Dev Biol*, 17:592-604.

Boivie J, Perl ER. Neural substrates of somatic sensation. In: Hunt, C.C. (szerk.) *MTP International Review of Science, Physiology Series One, Volume 3, Neurophysiology*. University Park Press, Baltimore, 1975, pp. 303-411.

Broman J, Anderson S, Ottersen OP. (1993) Enrichment of glutamate-like immunoreactivity in primary afferent terminals throughout the spinal cord dorsal horn. *Eur J Neurosci*, 5:1050-1061.

Brown JL, Liu H, Maggio JE, Vigna SR, Mantyh PW, Basbaum AI. (1995) Morphological characterization of substance P receptor-immunoreactive neurons in the rat spinal cord and trigeminal nucleus caudalis. *J Comp Neurol*, 356:327-344.

Brumovsky P, Hygge-Blakeman K, Villar MJ, Watanabe M, Wiesenfeld-Hallin Z, Hokfelt T. (2006) Phenotyping of sensory and sympathetic ganglion neurons of a galanin-overexpressing mouse--possible implications for pain processing. *J Chem Neuroanat*, 31:243-262.

Budai D, Larson AA. (1996) Role of substance P in the modulation of C-fiber-evoked responses of spinal dorsal horn neurons. *Brain Res*, 710:197-203.

Cajal SR. *Histology of the Nervous System of Man and Vertebrates. Vol. 1. General principles, spinal cord, spinal ganglia, medulla and pons.* . kiadás, (Az eredeti mű angol nyelvű fordítása, Swanson, N és Swanson, LW, Oxford University Press, New York, 1995), 1952.

Carlezon WA, Jr., Thome J, Olson VG, Lane-Ladd SB, Brodkin ES, Hiroi N, Duman RS, Neve RL, Nestler EJ. (1998) Regulation of cocaine reward by CREB. *Science*, 282:2272-2275.

Carlton SM, McNeill DL, Chung K, Coggeshall RE. (1987) A light and electron microscopic level analysis of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the spinal cord of the primate: an immunohistochemical study. *Neurosci Lett*, 82:145-150.

Carlton SM, Coggeshall RE. (1996) Stereological analysis of galanin and CGRP synapses in the dorsal horn of neuropathic primates. *Brain Res*, 711:16-25.

Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D. (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature*, 398:436-441.

Caterina MJ, Julius D. (2001) The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci*, 24:487-517.

Cechetto DF, Standaert DG, Saper CB. (1985) Spinal and trigeminal dorsal horn projections to the parabrachial nucleus in the rat. *J Comp Neurol*, 240:153-160.

Ch'ng JL, Christofides ND, Anand P, Gibson SJ, Allen YS, Su HC, Tatemoto K, Morrison JF, Polak JM, Bloom SR. (1985) Distribution of galanin immunoreactivity in the central nervous system and the responses of galanin-containing neuronal pathways to injury. *Neuroscience*, 16:343-354.

Colvin LA, Mark MA, Duggan AW. (1997) The effect of a peripheral mononeuropathy on immunoreactive (ir)-galanin release in the spinal cord of the rat. *Brain Res*, 766:259-261.

Coronel MF, Brumovsky PR, Hokfelt T, Villar MJ. (2008) Differential galanin upregulation in dorsal root ganglia and spinal cord after graded single ligature nerve constriction of the rat sciatic nerve. *J Chem Neuroanat*, 35:94-100.

Couceyro P, Paquet M, Koylu E, Kuhar MJ, Smith Y. (1998) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide immunoreactivity in myenteric plexus neurons of the rat ileum and co-localization with choline acetyltransferase. *Synapse*, 30:1-8.

Couceyro PR, Koylu EO, Kuhar MJ. (1997) Further studies on the anatomical distribution of CART by in situ hybridization. *J Chem Neuroanat*, 12:229-241.

Cowles RA, Segura BJ, Mulholland MW. (2001) Stimulation of rat pancreatic exocrine secretion by cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide. *Regul Pept*, 99:61-68.

Craig AD, Kniffki KD. (1985) Spinothalamic lumbosacral lamina I cells responsive to skin and muscle stimulation in the cat. *J Physiol*, 365:197-221.

Craig AD. (1995) Distribution of brainstem projections from spinal lamina I neurons in the cat and the monkey. *J Comp Neurol*, 361:225-248.

Craig AD. (2003a) A new view of pain as a homeostatic emotion. *Trends Neurosci*, 26:303-307.

Craig AD. (2003b) Pain mechanisms: labeled lines versus convergence in central processing. *Annu Rev Neurosci*, 26:1-30.

D'Mello R, Dickenson AH. (2008) Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth*, 101:8-16.

Dahlin LB, Stenberg L, Kanje M. (2003) Galanin expression in sensory neurons after nerve compression or transection. *Neuroreport*, 14:359-362.

Damaj MI, Hunter RG, Martin BR, Kuhar MJ. (2004) Intrathecal CART (55-102) enhances the spinal analgesic actions of morphine in mice. *Brain Res*, 1024:146-149.

Damaj MI, Zheng J, Martin BR, Kuhar MJ. (2006) Intrathecal CART (55-102) attenuates hyperlagesia and allodynia in a mouse model of neuropathic but not inflammatory pain. *Peptides*, 27:2019-2023.

De Biasi S, Rustioni A. (1988) Glutamate and substance P coexist in primary afferent terminals in the superficial laminae of spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85:7820-7824.

De Koninck Y, Henry JL. (1991) Substance P-mediated slow excitatory postsynaptic potential elicited in dorsal horn neurons in vivo by noxious stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88:11344-11348.

del Giudice EM, Santoro N, Cirillo G, D'Urso L, Di Toro R, Perrone L. (2001) Mutational screening of the CART gene in obese children: identifying a mutation (Leu34Phe) associated with reduced resting energy expenditure and cosegregating with obesity phenotype in a large family. *Diabetes*, 50:2157-2160.

Dey A, Xhu X, Carroll R, Turck CW, Stein J, Steiner DF. (2003) Biological processing of the cocaine and amphetamine-regulated transcript precursors by prohormone convertases, PC2 and PC1/3. *J Biol Chem*, 278:15007-15014.

DiFiglia M, Aronin N, Leeman SE. (1982) Light microscopic and ultrastructural localization of immunoreactive substance P in the dorsal horn of monkey spinal cord. *Neuroscience*, 7:1127-1139.

Dominguez G, Lakatos A, Kuhar MJ. (2002) Characterization of the cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide gene promoter and its activation by a cyclic AMP-dependent signaling pathway in GH3 cells. *J Neurochem*, 80:885-893.

Dominguez G, del Giudice EM, Kuhar MJ. (2004) CART peptide levels are altered by a mutation associated with obesity at codon 34. *Mol Psychiatry*, 9:1065-1066.

Dominguez G. (2006) The CART gene: structure and regulation. *Peptides*, 27:1913-1918.

Dostrovsky JO, Craig AD. (1996) Cooling-specific spinothalamic neurons in the monkey. *J Neurophysiol*, 76:3656-3665.

Douglass J, McKinzie AA, Couceyro P. (1995) PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *J Neurosci*, 15:2471-2481.

Douglass J, Daoud S. (1996) Characterization of the human cDNA and genomic DNA encoding CART: a cocaine- and amphetamine-regulated transcript. *Gene*, 169:241-245.

Doyle CA, Hunt SP. (1999) Substance P receptor (neurokinin-1)-expressing neurons in lamina I of the spinal cord encode for the intensity of noxious stimulation: a c-Fos study in rat. *Neuroscience*, 89:17-28.

Drew GM, Siddall PJ, Duggan AW. (2004) Mechanical allodynia following contusion injury of the rat spinal cord is associated with loss of GABAergic inhibition in the dorsal horn. *Pain*, 109:379-388.

Dun NJ, Dun SL, Kwok EH, Yang J, Chang J. (2000) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript-immunoreactivity in the rat sympatho-adrenal axis. *Neurosci Lett*, 283:97-100.

Dun SL, Brailoiu GC, Yang J, Chang JK, Dun NJ. (2006) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide and sympatho-adrenal axis. *Peptides*, 27:1949-1955.

Dylag T, Kotlinska J, Rafalski P, Pachuta A, Silberring J. (2006) The activity of CART peptide fragments. *Peptides*, 27:1926-1933.

Ekblad E, Kuhar M, Wierup N, Sundler F. (2003) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript: distribution and function in rat gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil*, 15:545-557.

Ekblad E. (2006) CART in the enteric nervous system. *Peptides*, 27:2024-2030.

Elias CF, Lee CE, Kelly JF, Ahima RS, Kuhar M, Saper CB, Elmquist JK. (2001) Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. *J Comp Neurol*, 432:1-19.

Erlanger J, Gasser HS. *Electrical Signs of Nervous Activity.* kiadás, University of Pennsylvania Press Philadelphia, 1937.

Fekete C, Mihaly E, Luo LG, Kelly J, Clausen JT, Mao Q, Rand WM, Moss LG, Kuhar M, Emerson CH, Jackson IM, Lechan RM. (2000) Association of cocaine- and amphetamine-regulated transcript-immunoreactive elements with thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and its role in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis during fasting. *J Neurosci*, 20:9224-9234.

Fekete C, Wittmann G, Liposits Z, Lechan RM. (2004) Origin of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART)-immunoreactive innervation of the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Comp Neurol*, 469:340-350.

Garcia-Anoveros J, Samad TA, Zuvela-Jelaska L, Woolf CJ, Corey DP. (2001) Transport and localization of the DEG/ENaC ion channel BNaC1alpha to peripheral mechanosensory terminals of dorsal root ganglia neurons. *J Neurosci*, 21:2678-2686.

Garraway SM, Pockett S, Hochman S. (1997) Primary afferent-evoked synaptic plasticity in deep dorsal horn neurons from neonatal rat spinal cord in vitro. *Neurosci Lett*, 230:61-64.

Gasser HS. (1950) Unmedullated fibers originating in dorsal root ganglia. *J Gen Physiol*, 33:651-690.

Gauriau C, Bernard JF. (2002) Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. *Exp Physiol*, 87:251-258.

Gobel S. (1978) Golgi studies of the neurons in layer I of the dorsal horn of the medulla (trigeminal nucleus caudalis). *J Comp Neurol*, 180:375-393.

Graham BA, Brichta AM, Callister RJ. (2007) Moving from an averaged to specific view of spinal cord pain processing circuits. *J Neurophysiol*, 98:1057-1063.

Grudt TJ, Perl ER. (2002) Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. *J Physiol*, 540:189-207.

Habelt C, Kessler F, Distler C, Kress M, Reeh PW. (2000) Interactions of inflammatory mediators and low pH not influenced by capsazepine in rat cutaneous nociceptors. *Neuroreport*, 11:973-976.

Han ZS, Zhang ET, Craig AD. (1998) Nociceptive and thermoreceptive lamina I neurons are anatomically distinct. *Nat Neurosci*, 1:218-225.

Harvey RJ, Depner UB, Wassle H, Ahmadi S, Heindl C, Reinold H, Smart TG, Harvey K, Schutz B, Abo-Salem OM, Zimmer A, Poisbeau P, Welzl H, Wolfer DP, Betz H, Zeilhofer HU, Muller U. (2004) GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science*, 304:884-887.

Hayes ES, Carlton SM. (1992) Primary afferent interactions: analysis of calcitonin gene-related peptide-immunoreactive terminals in contact with unlabeled and GABA-immunoreactive profiles in the monkey dorsal horn. *Neuroscience*, 47:873-896.

Heinke B, Ruscheweyh R, Forsthuber L, Wunderbaldinger G, Sandkuhler J. (2004) Physiological, neurochemical and morphological properties of a subgroup of GABAergic spinal lamina II neurones identified by expression of green fluorescent protein in mice. *J Physiol*, 560:249-266.

Herrero JF, Laird JM, Lopez-Garcia JA. (2000) Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something? *Prog Neurobiol*, 61:169-203.

Hiura A, Nasu F, Ishizuka H. (1998) Relationship of substance P- and CGRP-immunoreactive central endings of the primary afferent neurons to GABAergic interneurons in the guinea pig substantia gelatinosa. *Okajimas Folia Anat Jpn*, 74:231-235.

Hokfelt T, Elde R, Johansson O, Luft R, Nilsson G, Arimura A. (1976) Immunohistochemical evidence for separate populations of somatostatin-containing and substance P-containing primary afferent neurons in the rat. *Neuroscience*, 1:131-136.

Hokfelt T, Wiesenfeld-Hallin Z, Villar M, Melander T. (1987) Increase of galanin-like immunoreactivity in rat dorsal root ganglion cells after peripheral axotomy. *Neurosci Lett*, 83:217-220.

Holmes FE, Bacon A, Pope RJ, Vanderplank PA, Kerr NC, Sukumaran M, Pachnis V, Wynick D. (2003) Transgenic overexpression of galanin in the dorsal root ganglia modulates pain-related behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100:6180-6185.

Hsun Lin H, Chiu HY, Lai CC. (2005) Potentiation of spinal N-methyl-D-aspartate-mediated nociceptive transmission by cocaine-regulated and amphetamine-regulated transcript peptide in rats. *Neuroreport*, 16:253-257.

Hua XY, Hayes CS, Hofer A, Fitzsimmons B, Kilk K, Langel U, Bartfai T, Yaksh TL. (2004) Galanin acts at GalR1 receptors in spinal antinociception: synergy with morphine and AP-5. *J Pharmacol Exp Ther*, 308:574-582.

Hunt SP, Mantyh PW, Priestley JV. The organization of biochemically characterized sensory neurons. In: Scott, S.A. (szerk.) *Sensory Neurons: Diversity, Development and Plasticity*. Oxford University Press, New York, 1992, pp. 60-76.

Hwang LL, Chen CT, Li TL, Chiu CZ, Chi SF. (2004) Central pressor effects of CART peptides in anesthetized rats. *Neuropeptides*, 38:69-76.

Hylden JL, Anton F, Nahin RL. (1989) Spinal lamina I projection neurons in the rat: collateral innervation of parabrachial area and thalamus. *Neuroscience*, 28:27-37.

Iliff JJ, Alkayed NJ, Gloshani KJ, Traystman RJ, West GA. (2005) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide: a vasoactive role in the cerebral circulation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 25:1376-1385.

Immke DC, McCleskey EW. (2001) ASIC3: a lactic acid sensor for cardiac pain. *ScientificWorldJournal*, 1:510-512.

Ji RR, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ. (2003) Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci*, 26:696-705.

Jones DC, Kuhar MJ. (2006) Cocaine-amphetamine-regulated transcript expression in the rat nucleus accumbens is regulated by adenylyl cyclase and the cyclic adenosine 5'-monophosphate/protein kinase a second messenger system. *J Pharmacol Exp Ther*, 317:454-461.

Jones DC, Kuhar MJ. (2008) CART receptor binding in primary cell cultures of the rat nucleus accumbens. *Synapse*, 62:122-127.

Ju G, Hokfelt T, Brodin E, Fahrenkrug J, Fischer JA, Frey P, Elde RP, Brown JC. (1987) Primary sensory neurons of the rat showing calcitonin gene-related peptide immunoreactivity and their relation to substance P-, somatostatin-, galanin-, vasoactive intestinal polypeptide- and cholecystokinin-immunoreactive ganglion cells. *Cell Tissue Res*, 247:417-431.

Jung SK, Hong MS, Suh GJ, Jin SY, Lee HJ, Kim BS, Lim YJ, Kim MK, Park HK, Chung JH, Yim SV. (2004) Association between polymorphism in intron 1 of cocaine- and amphetamine-regulated transcript gene with alcoholism, but not with bipolar disorder and schizophrenia in Korean population. *Neurosci Lett*, 365:54-57.

Kellstein DE, Price DD, Hayes RL, Mayer DJ. (1990) Evidence that substance P selectively modulates C-fiber-evoked discharges of dorsal horn nociceptive neurons. *Brain Res*, 526:291-298.

Kerr BJ, Cafferty WB, Gupta YK, Bacon A, Wynick D, McMahon SB, Thompson SW. (2000) Galanin knockout mice reveal nociceptive deficits following peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci*, 12:793-802.

Kerr BJ, Thompson SW, Wynick D, McMahon SB. (2001) Endogenous galanin is required for the full expression of central sensitization following peripheral nerve injury. *Neuroreport*, 12:3331-3334.

Khasabov SG, Rogers SD, Ghilardi JR, Peters CM, Mantyh PW, Simone DA. (2002) Spinal neurons that possess the substance P receptor are required for the development of central sensitization. *J Neurosci*, 22:9086-9098.

Konradi C, Cole RL, Heckers S, Hyman SE. (1994) Amphetamine regulates gene expression in rat striatum via transcription factor CREB. *J Neurosci*, 14:5623-5634.

Koylu EO, Couceyro PR, Lambert PD, Ling NC, DeSouza EB, Kuhar MJ. (1997) Immunohistochemical localization of novel CART peptides in rat hypothalamus, pituitary and adrenal gland. *J Neuroendocrinol*, 9:823-833.

Koylu EO, Couceyro PR, Lambert PD, Kuhar MJ. (1998) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide immunohistochemical localization in the rat brain. *J Comp Neurol*, 391:115-132.

Koylu EO, Balkan B, Kuhar MJ, Pogun S. (2006) Cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) and the stress response. *Peptides*, 27:1956-1969.

Kozsurek M, Lukacsi E, Fekete C, Wittmann G, Rethelyi M, Puskar Z. (2007) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide (CART) is present in peptidergic C primary afferents and axons of excitatory interneurons with a possible role in nociception in the superficial laminae of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci*, 26:1624-1631.

Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N, Larsen PJ, Hastrup S. (1998) Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature*, 393:72-76.

Kuhar MJ, Yoho LL. (1999) CART peptide analysis by Western blotting. *Synapse*, 33:163-171.

Kuhar MJ, Adams LD, Hunter RG, Vechia SD, Smith Y. (2000) CART peptides. *Regul Pept*, 89:1-6.

Kuhar MJ, Adams S, Dominguez G, Jaworski J, Balkan B. (2002) CART peptides. *Neuropeptides*, 36:1-8.

Kuhar MJ, Jaworski JN, Hubert GW, Philpot KB, Dominguez G. (2005) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptides play a role in drug abuse and are potential therapeutic targets. *Aaps J*, 7:E259-265.

Kuraishi Y, Kawabata S, Matsumoto T, Nakamura A, Fujita H, Satoh M. (1991) Involvement of substance P in hyperalgesia induced by intrathecal galanin. *Neurosci Res*, 11:276-285.

Kuriyama G, Takekoshi S, Tojo K, Nakai Y, Kuhar MJ, Osamura RY. (2004) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide in the rat anterior pituitary gland is localized in gonadotrophs and suppresses prolactin secretion. *Endocrinology*, 145:2542-2550.

Laing I, Todd AJ, Heizmann CW, Schmidt HH. (1994) Subpopulations of GABAergic neurons in laminae I-III of rat spinal dorsal horn defined by coexistence with classical transmitters, peptides, nitric oxide synthase or parvalbumin. *Neuroscience*, 61:123-132.

Lakatos A, Dominguez G, Kuhar MJ. (2002) CART promoter CRE site binds phosphorylated CREB. *Brain Res Mol Brain Res*, 104:81-85.

Lakatos A, Prinster S, Vicentic A, Hall RA, Kuhar MJ. (2005) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide activates the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway in AtT20 cells via putative G-protein coupled receptors. *Neurosci Lett*, 384:198-202.

Lambert PD, Couceyro PR, McGirr KM, Dall Vechia SE, Smith Y, Kuhar MJ. (1998) CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse*, 29:293-298.

LaMotte CC, Kapadia SE, Shapiro CM. (1991) Central projections of the sciatic, saphenous, median, and ulnar nerves of the rat demonstrated by transganglionic transport of choleragenoid-HRP (B-HRP) and wheat germ agglutinin-HRP (WGA-HRP). *J Comp Neurol*, 311:546-562.

Landry M, Bouali-Benazzouz R, El Mestikawy S, Ravassard P, Nagy F. (2004) Expression of vesicular glutamate transporters in rat lumbar spinal cord, with a note on dorsal root ganglia. *J Comp Neurol*, 468:380-394.

Lawson SN. Morphological and biochemical cell types of sensory neurons. In: Scott, S.A. (szerk.) *Sensory Neurons: Diversity, Development and Plasticity*. Oxford University Press, New York, 1992, pp. 27-59.

Lawson SN, Crepps BA, Perl ER. (1997) Relationship of substance P to afferent characteristics of dorsal root ganglion neurones in guinea-pig. *J Physiol*, 505 (Pt 1):177-191.

Lechan RM, Fekete C. (2006) The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Prog Brain Res*, 153:209-235.

Leslie RA, Sanders SJ, Anderson SI, Schuhler S, Horan TL, Ebling FJ. (2001) Appositions between cocaine and amphetamine-related transcript- and gonadotropin releasing hormone-immunoreactive neurons in the hypothalamus of the Siberian hamster. *Neurosci Lett*, 314:111-114.

Li JL, Ding YQ, Li YQ, Li JS, Nomura S, Kaneko T, Mizuno N. (1998) Immunocytochemical localization of mu-opioid receptor in primary afferent neurons containing substance P or calcitonin gene-related peptide. A light and electron microscope study in the rat. *Brain Res*, 794:347-352.

Li JL, Xiong KH, Dong YL, Fujiyama F, Kaneko T, Mizuno N. (2003) Vesicular glutamate transporters, VGluT1 and VGluT2, in the trigeminal ganglion neurons of the rat, with special reference to coexpression. *J Comp Neurol*, 463:212-220.

Light AR, Perl ER. (1979) Spinal termination of functionally identified primary afferent neurons with slowly conducting myelinated fibers. *J Comp Neurol*, 186:133-150.

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

Lima D, Coimbra A. (1988) The spinothalamic system of the rat: structural types of retrogradely labelled neurons in the marginal zone (lamina I). *Neuroscience*, 27:215-230.

Lima D, Mendes-Ribeiro JA, Coimbra A. (1991) The spino-latero-reticular system of the rat: projections from the superficial dorsal horn and structural characterization of marginal neurons involved. *Neuroscience*, 45:137-152.

Littlewood NK, Todd AJ, Spike RC, Watt C, Shehab SA. (1995) The types of neuron in spinal dorsal horn which possess neurokinin-1 receptors. *Neuroscience*, 66:597-608.

Liu H, Brown JL, Jasmin L, Maggio JE, Vigna SR, Mantyh PW, Basbaum AI. (1994) Synaptic relationship between substance P and the substance P receptor: light and electron microscopic characterization of the mismatch between neuropeptides and their receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91:1009-1013.

Liu HX, Hokfelt T. (2002) The participation of galanin in pain processing at the spinal level. *Trends Pharmacol Sci*, 23:468-474.

Liu XG, Sandkuhler J. (1995) Long-term potentiation of C-fiber-evoked potentials in the rat spinal dorsal horn is prevented by spinal N-methyl-D-aspartic acid receptor blockage. *Neurosci Lett*, 191:43-46.

Lopez-Garcia JA, King AE. (1994) Membrane properties of physiologically classified rat dorsal horn neurons in vitro: correlation with cutaneous sensory afferent input. *Eur J Neurosci*, 6:998-1007.

Ma W, Bisby MA. (1997) Differential expression of galanin immunoreactivities in the primary sensory neurons following partial and complete sciatic nerve injuries. *Neuroscience*, 79:1183-1195.

Maletinska L, Maixnerova J, Matyskova R, Haugvicova R, Sloncova E, Elbert T, Slaninova J, Zelezna B. (2007) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide specific binding in pheochromocytoma cells PC12. *Eur J Pharmacol*, 559:109-114.

Mantyh PW, DeMaster E, Malhotra A, Ghilardi JR, Rogers SD, Mantyh CR, Liu H, Basbaum AI, Vigna SR, Maggio JE, et al. (1995) Receptor endocytosis and dendrite reshaping in spinal neurons after somatosensory stimulation. *Science*, 268:1629-1632.

Mantyh PW, Rogers SD, Honore P, Allen BJ, Ghilardi JR, Li J, Daughters RS, Lappi DA, Wiley RG, Simone DA. (1997) Inhibition of hyperalgesia by ablation of lamina I spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science*, 278:275-279.

Mantyh PW, Hunt SP. (2004) Setting the tone: superficial dorsal horn projection neurons regulate pain sensitivity. *Trends Neurosci*, 27:582-584.

Mao P, Ardeshiri A, Jacks R, Yang S, Hurn PD, Alkayed NJ. (2007) Mitochondrial mechanism of neuroprotection by CART. *Eur J Neurosci*, 26:624-632.

Marshall GE, Shehab SA, Spike RC, Todd AJ. (1996) Neurokinin-1 receptors on lumbar spinothalamic neurons in the rat. *Neuroscience*, 72:255-263.

Marvizon JC, Martinez V, Grady EF, Bunnett NW, Mayer EA. (1997) Neurokinin 1 receptor internalization in spinal cord slices induced by dorsal root stimulation is mediated by NMDA receptors. *J Neurosci*, 17:8129-8136.

Matsumura K, Tsuchihashi T, Abe I. (2001) Central human cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide 55-102 increases arterial pressure in conscious rabbits. *Hypertension*, 38:1096-1100.

Melzack R, Wall PD. (1962) On the nature of cutaneous sensory mechanisms. *Brain*, 85:331-356.

Melzack R, Wall PD. (1965) Pain mechanisms: a new theory. *Science*, 150:971-979.

Mendell LM. (1966) Physiological properties of unmyelinated fiber projection to the spinal cord. *Exp Neurol*, 16:316-332.

Menetrey D, Chaouch A, Binder D, Besson JM. (1982) The origin of the spinomesencephalic tract in the rat: an anatomical study using the retrograde transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol*, 206:193-207.

Menyhert J, Wittmann G, Lechan RM, Keller E, Liposits Z, Fekete C. (2007) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) is colocalized with the orexigenic neuropeptide Y and agouti-related protein and absent from the anorexigenic alpha-melanocyte-stimulating hormone neurons in the infundibular nucleus of the human hypothalamus. *Endocrinology*, 148:4276-4281.

Millan MJ. (1999) The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*, 57:1-164.

Millan MJ. (2002) Descending control of pain. *Prog Neurobiol*, 66:355-474.

Moore KA, Kohno T, Karchewski LA, Scholz J, Baba H, Woolf CJ. (2002) Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J Neurosci*, 22:6724-6731.

Nagy GG, Al-Ayyan M, Andrew D, Fukaya M, Watanabe M, Todd AJ. (2004) Widespread expression of the AMPA receptor GluR2 subunit at glutamatergic synapses in the rat spinal cord and phosphorylation of GluR1 in response to noxious stimulation revealed with an antigen-unmasking method. *J Neurosci*, 24:5766-5777.

Nichols ML, Allen BJ, Rogers SD, Ghilardi JR, Honore P, Luger NM, Finke MP, Li J, Lappi DA, Simone DA, Mantyh PW. (1999) Transmission of chronic nociception by spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science*, 286:1558-1561.

Ohsawa M, Dun SL, Tseng LF, Chang J, Dun NJ. (2000) Decrease of hindpaw withdrawal latency by cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide to the mouse spinal cord. *Eur J Pharmacol*, 399:165-169.

Okumura T, Yamada H, Motomura W, Kohgo Y. (2000) Cocaine-amphetamine-regulated transcript (CART) acts in the central nervous system to inhibit gastric acid secretion via brain corticotropin-releasing factor system. *Endocrinology*, 141:2854-2860.

Oliveira AL, Hydling F, Olsson E, Shi T, Edwards RH, Fujiyama F, Kaneko T, Hokfelt T, Cullheim S, Meister B. (2003) Cellular localization of three vesicular glutamate transporter mRNAs and proteins in rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Synapse*, 50:117-129.

Palkovits M. (2000) [The brain and the pain: neurotransmitters and neuronal pathways of pain perception and response]. *Orv Hetil*, 141:2231-2239.

Parent AS, Lebrethon MC, Gerard A, Vandersmissen E, Bourguignon JP. (2000) Leptin effects on pulsatile gonadotropin releasing hormone secretion from the adult rat hypothalamus and interaction with cocaine and amphetamine regulated transcript peptide and neuropeptide Y. *Regul Pept*, 92:17-24.

Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain Map in Stereotaxic Coordinates.* 4. kiadás, Academic Press, San Diego, 1998.

Perl ER. (1971) Is pain a specific sensation? *J Psychiatr Res*, 8:273-287.

Pockett S. (1995) Spinal cord synaptic plasticity and chronic pain. *Anesth Analg*, 80:173-179.

Polgar E, Puskar Z, Watt C, Matesz C, Todd AJ. (2002) Selective innervation of lamina I projection neurones that possess the neurokinin 1 receptor by serotonin-containing axons in the rat spinal cord. *Neuroscience*, 109:799-809.

Polgar E, Hughes DI, Riddell JS, Maxwell DJ, Puskar Z, Todd AJ. (2003) Selective loss of spinal GABAergic or glycinergic neurons is not necessary for development of thermal hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Pain*, 104:229-239.

Polgar E, Gray S, Riddell JS, Todd AJ. (2004) Lack of evidence for significant neuronal loss in laminae I-III of the spinal dorsal horn of the rat in the chronic constriction injury model. *Pain*, 111:144-150.

Price DD, Dubner R. (1977) Neurons that subserve the sensory-discriminative aspects of pain. *Pain*, 3:307-338.

Price DD. *Physical and Neural Mechanisms of Pain.* 1. kiadás, Raven, New York, 1988.

Price MP, Lewin GR, McIlwrath SL, Cheng C, Xie J, Heppenstall PA, Stucky CL, Mannsfeldt AG, Brennan TJ, Drummond HA, Qiao J, Benson CJ, Tarr DE, Hrstka RF, Yang B, Williamson RA, Welsh MJ. (2000) The mammalian sodium channel BNC1 is required for normal touch sensation. *Nature*, 407:1007-1011.

Proudlock F, Spike RC, Todd AJ. (1993) Immunocytochemical study of somatostatin, neurotensin, GABA, and glycine in rat spinal dorsal horn. *J Comp Neurol*, 327:289-297.

Randic M, Jiang MC, Cerne R. (1993) Long-term potentiation and long-term depression of primary afferent neurotransmission in the rat spinal cord. *J Neurosci*, 13:5228-5241.

Raptis S, Fekete C, Sarkar S, Rand WM, Emerson CH, Nagy GM, Lechan RM. (2004) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript co-contained in thyrotropin-releasing hormone (TRH) neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus modulates TRH-induced prolactin secretion. *Endocrinology*, 145:1695-1699.

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

Rexed B. (1952) The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol*, 96:414-495.

Ribeiro-da-Silva A, Tagari P, Cuello AC. (1989) Morphological characterization of substance P-like immunoreactive glomeruli in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord and trigeminal subnucleus caudalis: a quantitative study. *J Comp Neurol*, 281:497-415.

Ribeiro-da-Silva A. (1995) Ultrastructural features of the colocalization of calcitonin gene related peptide with substance P or somatostatin in the dorsal horn of the spinal cord. *Can J Physiol Pharmacol*, 73:940-944.

Rivero-Melian C, Grant G. (1991) Choleragenoid horseradish peroxidase used for studying projections of some hindlimb cutaneous nerves and plantar foot afferents to the dorsal horn and Clarke's column in the rat. *Exp Brain Res*, 84:125-132.

Robertson B, Grant G. (1985) A comparison between wheat germ agglutinin-and choleragenoid-horseradish peroxidase as anterogradely transported markers in central branches of primary sensory neurones in the rat with some observations in the cat. *Neuroscience*, 14:895-905.

Rohner-Jeanrenaud F, Craft LS, Bridwell J, Suter TM, Tinsley FC, Smiley DL, Burkhart DR, Statnick MA, Heiman ML, Ravussin E, Caro JF. (2002) Chronic central infusion of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART 55-102): effects on body weight homeostasis in lean and high-fat-fed obese rats. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 26:143-149.

Rowan S, Todd AJ, Spike RC. (1993) Evidence that neuropeptide Y is present in GABAergic neurons in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience*, 53:537-545.

Ruscheweyh R, Sandkuhler J. (2002) Lamina-specific membrane and discharge properties of rat spinal dorsal horn neurones in vitro. *J Physiol*, 541:231-244.

Ruscheweyh R, Ikeda H, Heinke B, Sandkuhler J. (2004) Distinctive membrane and discharge properties of rat spinal lamina I projection neurones in vitro. *J Physiol*, 555:527-543.

Rygh LJ, Svendsen F, Fiska A, Haugan F, Hole K, Tjolsen A. (2005) Long-term potentiation in spinal nociceptive systems--how acute pain may become chronic. *Psychoneuroendocrinology*, 30:959-964.

Sandkuhler J. (2007) Understanding LTP in pain pathways. *Mol Pain*, 3:9.

Sarkar S, Wittmann G, Fekete C, Lechan RM. (2004) Central administration of cocaine- and amphetamine-regulated transcript increases phosphorylation of cAMP response element binding protein in corticotropin-releasing hormone-producing neurons but not in prothyrotropin-releasing hormone-producing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res*, 999:181-192.

Sherrington CS. *The Integrative Action of the Nervous System.* 2. kiadás, Yale University Press, New Heaven, 1906.

Silverman JD, Kruger L. (1990) Selective neuronal glycoconjugate expression in sensory and autonomic ganglia: relation of lectin reactivity to peptide and enzyme markers. *J Neurocytol*, 19:789-801.

Simmons DR, Spike RC, Todd AJ. (1995) Galanin is contained in GABAergic neurons in the rat spinal dorsal horn. *Neurosci Lett*, 187:119-122.

Singh MK, Elefteriou F, Karsenty G. (2008) Cocaine and amphetamine-regulated transcript may regulate bone remodeling as a circulating molecule. *Endocrinology*, 149:3933-3941.

Singru PS, Mazumdar M, Sakharkar AJ, Lechan RM, Thim L, Clausen JT, Subhedar NK. (2007) Immunohistochemical localization of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide in the brain of the catfish, Clarias batrachus (Linn.). *J Comp Neurol*, 502:215-235.

Smith Y, Kieval J, Couceyro PR, Kuhar MJ. (1999) CART peptide-immunoreactive neurones in the nucleus accumbens in monkeys: ultrastructural analysis, colocalization studies, and synaptic interactions with dopaminergic afferents. *J Comp Neurol*, 407:491-511.

Spiess J, Villarreal J, Vale W. (1981) Isolation and sequence analysis of a somatostatin-like polypeptide from ovine hypothalamus. *Biochemistry*, 20:1982-1988.

Spike RC, Puskar Z, Andrew D, Todd AJ. (2003) A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord. *Eur J Neurosci*, 18:2433-2448.

Stanley SA, Small CJ, Murphy KG, Rayes E, Abbott CR, Seal LJ, Morgan DG, Sunter D, Dakin CL, Kim MS, Hunter R, Kuhar M, Ghatei MA, Bloom SR. (2001) Actions of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide on regulation of appetite and hypothalamo-pituitary axes in vitro and in vivo in male rats. *Brain Res*, 893:186-194.

Stein J, Steiner DF, Dey A. (2006) Processing of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) precursor proteins by prohormone convertases (PCs) and its implications. *Peptides*, 27:1919-1925.

Stewart W, Maxwell DJ. (2000) Morphological evidence for selective modulation by serotonin of a subpopulation of dorsal horn cells which possess the neurokinin-1 receptor. *Eur J Neurosci*, 12:4583-4588.

Sugiura Y, Lee CL, Perl ER. (1986) Central projections of identified, unmyelinated (C) afferent fibers innervating mammalian skin. *Science*, 234:358-361.

Sutherland SP, Benson CJ, Adelman JP, McCleskey EW. (2001) Acid-sensing ion channel 3 matches the acid-gated current in cardiac ischemia-sensing neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98:711-716.

Suzuki R, Morcuende S, Webber M, Hunt SP, Dickenson AH. (2002) Superficial NK1-expressing neurons control spinal excitability through activation of descending pathways. *Nat Neurosci*, 5:1319-1326.

Svendsen F, Tjolsen A, Hole K. (1998) AMPA and NMDA receptor-dependent spinal LTP after nociceptive tetanic stimulation. *Neuroreport*, 9:1185-1190.

Szentagothai J. (1964) Neuronal and Synaptic Arrangement in the Substantia Gelatinosa Rolandi. *J Comp Neurol*, 122:219-239.

Tebbe JJ, Ortmann E, Schumacher K, Monnikes H, Kobelt P, Arnold R, Schafer MK. (2004) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript stimulates colonic motility via central CRF receptor activation and peripheral cholinergic pathways in fed, conscious rats. *Neurogastroenterol Motil*, 16:489-496.

Thim L, Nielsen PF, Judge ME, Andersen AS, Diers I, Egel-Mitani M, Hastrup S. (1998) Purification and characterisation of a new hypothalamic satiety peptide, cocaine and amphetamine regulated transcript (CART), produced in yeast. *FEBS Lett*, 428:263-268.

Thim L, Kristensen P, Nielsen PF, Wulff BS, Clausen JT. (1999) Tissue-specific processing of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptides in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96:2722-2727.

Thomson AM, West DC, Headley PM. (1989) Membrane Characteristics and Synaptic Responsiveness of Superficial Dorsal Horn Neurons in a Slice Preparation of Adult Rat Spinal Cord. *Eur J Neurosci*, 1:479-488.

Todd AJ, Sullivan AC. (1990) Light microscope study of the coexistence of GABA-like and glycine-like immunoreactivities in the spinal cord of the rat. *J Comp Neurol*, 296:496-505.

Todd AJ. (1991) Immunohistochemical evidence that acetylcholine and glycine exist in different populations of GABAergic neurons in lamina III of rat spinal dorsal horn. *Neuroscience*, 44:741-746.

Todd AJ, Russell G, Spike RC. (1992a) Immunocytochemical evidence that GABA and neurotensin exist in different neurons in laminae II and III of rat spinal dorsal horn. *Neuroscience*, 47:685-691.

Todd AJ, Spike RC, Russell G, Johnston HM. (1992b) Immunohistochemical evidence that Met-enkephalin and GABA coexist in some neurones in rat dorsal horn. *Brain Res*, 584:149-156.

Todd AJ, Spike RC. (1993) The localization of classical transmitters and neuropeptides within neurons in laminae I-III of the mammalian spinal dorsal horn. *Prog Neurobiol*, 41:609-645.

Todd AJ, Spike RC, Price RF, Neilson M. (1994) Immunocytochemical evidence that neurotensin is present in glutamatergic neurons in the superficial dorsal horn of the rat. *J Neurosci*, 14:774-784.

Todd AJ, McGill MM, Shehab SA. (2000) Neurokinin 1 receptor expression by neurons in laminae I, III and IV of the rat spinal dorsal horn that project to the brainstem. *Eur J Neurosci*, 12:689-700.

Todd AJ, Puskar Z, Spike RC, Hughes C, Watt C, Forrest L. (2002) Projection neurons in lamina I of rat spinal cord with the neurokinin 1 receptor are selectively innervated by substance p-containing afferents and respond to noxious stimulation. *J Neurosci*, 22:4103-4113.

Todd AJ, Hughes DI, Polgar E, Nagy GG, Mackie M, Ottersen OP, Maxwell DJ. (2003) The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn. *Eur J Neurosci*, 17:13-27.

Todd AJ, Koerber HR. Neuroanatomical substrates of spinal nociception. In: McMahon, S.B., Koltzenburg, M. (szerk.) *Wall and Melzack's Textbook of Pain, 5th Edition*. Churchill Livingstone, Edinburgh, 2005, pp. 73-90.

Todd AJ, Spike RC, Young S, Puskar Z. (2005) Fos induction in lamina I projection neurons in response to noxious thermal stimuli. *Neuroscience*, 131:209-217.

Torebjork HE. (1974) Afferent C units responding to mechanical, thermal and chemical stimuli in human non-glabrous skin. *Acta Physiol Scand*, 92:374-390.

Torsney C, MacDermott AB. (2006) Disinhibition opens the gate to pathological pain signaling in superficial neurokinin 1 receptor-expressing neurons in rat spinal cord. *J Neurosci*, 26:1833-1843.

Trevino DL, Carstens E. (1975) Confirmation of the location of spinothalamic neurons in the cat and monkey by the retrograde transport of horseradish peroxidase. *Brain Res*, 98:177-182.

Tuchscherer MM, Seybold VS. (1989) A quantitative study of the coexistence of peptides in varicosities within the superficial laminae of the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Neurosci*, 9:195-205.

Vadivelu N, Sinatra R. (2005) Recent advances in elucidating pain mechanisms. *Curr Opin Anaesthesiol*, 18:540-547.

Valle E, Moore SS, Jann O, Williams JL, Crews DH, Jr., Benkel BF. (2005) The bovine cocaine and amphetamine-regulated transcript locus: gene characterization and SNP discovery. *Anim Genet*, 36:74-75.

van den Pol AN. (1986) Tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons throughout the hypothalamus receive glutamate decarboxylase immunoreactive synapses: a double pre-embedding immunocytochemical study with particulate silver and HRP. *J Neurosci*, 6:877-891.

Vicentic A, Lakatos A, Kuhar MJ. (2005) CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide receptors: specific binding in AtT20 cells. *Eur J Pharmacol*, 528:188-189.

Villar MJ, Cortes R, Theodorsson E, Wiesenfeld-Hallin Z, Schalling M, Fahrenkrug J, Emson PC, Hokfelt T. (1989) Neuropeptide expression in rat dorsal root ganglion cells and spinal cord after peripheral nerve injury with special reference to galanin. *Neuroscience*, 33:587-604.

Villar MJ, Wiesenfeld-Hallin Z, Xu XJ, Theodorsson E, Emson PC, Hokfelt T. (1991) Further studies on galanin-, substance P-, and CGRP-like immunoreactivities in primary sensory neurons and spinal cord: effects of dorsal rhizotomies and sciatic nerve lesions. *Exp Neurol*, 112:29-39.

Volkoff H, Peter RE. (2001) Characterization of two forms of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide precursors in goldfish: molecular cloning and distribution, modulation of expression by nutritional status, and interactions with leptin. *Endocrinology*, 142:5076-5088.

Vrang N, Larsen PJ, Clausen JT, Kristensen P. (1999a) Neurochemical characterization of hypothalamic cocaine- amphetamine-regulated transcript neurons. *J Neurosci*, 19:RC5.

Vrang N, Tang-Christensen M, Larsen PJ, Kristensen P. (1999b) Recombinant CART peptide induces c-Fos expression in central areas involved in control of feeding behaviour. *Brain Res*, 818:499-509.

Vrang N, Larsen PJ, Kristensen P, Tang-Christensen M. (2000) Central administration of cocaine-amphetamine-regulated transcript activates hypothalamic neuroendocrine neurons in the rat. *Endocrinology*, 141:794-801.

Wall PD. Dorsal horn electrophysiology. In: Iggo, A. (szerk.) *Handbook of Sensory Physiology-Somatosensory Systems*. Springer-Verlag, Berlin, 1973, pp. 253-270.

Wang C, Billington CJ, Levine AS, Kotz CM. (2000) Effect of CART in the hypothalamic paraventricular nucleus on feeding and uncoupling protein gene expression. *Neuroreport*, 11:3251-3255.

Wierup N, Bjorkqvist M, Kuhar MJ, Mulder H, Sundler F. (2006) CART regulates islet hormone secretion and is expressed in the beta-cells of type 2 diabetic rats. *Diabetes*, 55:305-311.

Wierup N, Sundler F. (2006) CART is a novel islet regulatory peptide. *Peptides*, 27:2031-2036.

Wiesenfeld-Hallin Z, Xu XJ, Crawley JN, Hokfelt T. (2005) Galanin and spinal nociceptive mechanisms: recent results from transgenic and knock-out models. *Neuropeptides*, 39:207-210.

Willis WD. *The Pain System.* kiadás, Karger, Basel, 1985.

Willis WD, Westlund KN. (1997) Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J Clin Neurophysiol*, 14:2-31.

Willis WD, Coggeshall RE. *Sensory Mechanisms of the Spinal Cord.* 3. kiadás, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2004.

Wittmann G, Liposits Z, Lechan RM, Fekete C. (2004) Medullary adrenergic neurons contribute to the cocaine- and amphetamine-regulated transcript-immunoreactive innervation of thyrotropin-releasing hormone synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res*, 1006:1-7.

Wittmann G, Liposits Z, Lechan RM, Fekete C. (2005) Origin of cocaine- and amphetamine-regulated transcript-containing axons innervating hypophysiotropic corticotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the rat. *Endocrinology*, 146:2985-2991.

Woolf CJ, Shortland P, Reynolds M, Ridings J, Doubell T, Coggeshall RE. (1995) Reorganization of central terminals of myelinated primary afferents in the rat dorsal horn following peripheral axotomy. *J Comp Neurol*, 360:121-134.

Wu B, Hu S, Yang M, Pan H, Zhu S. (2006) CART peptide promotes the survival of hippocampal neurons by upregulating brain-derived neurotrophic factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 347:656-661.

Xu Y, Zhang W, Klaus J, Young J, Koerner I, Sheldahl LC, Hurn PD, Martinez-Murillo F, Alkayed NJ. (2006) Role of cocaine- and amphetamine-regulated transcript in estradiol-mediated neuroprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103:14489-14494.

Yaksh TL. (1989) Behavioral and autonomic correlates of the tactile evoked allodynia produced by spinal glycine inhibition: effects of modulatory receptor systems and excitatory amino acid antagonists. *Pain*, 37:111-123.

Yanik T, Dominguez G, Kuhar MJ, Del Giudice EM, Loh YP. (2006) The Leu34Phe ProCART mutation leads to cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) deficiency: a possible cause for obesity in humans. *Endocrinology*, 147:39-43.

Yermolaieva O, Chen J, Couceyro PR, Hoshi T. (2001) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide modulation of voltage-gated Ca2+ signaling in hippocampal neurons. *J Neurosci*, 21:7474-7480.

Yu XH, Zhang ET, Craig AD, Shigemoto R, Ribeiro-da-Silva A, De Koninck Y. (1999) NK-1 receptor immunoreactivity in distinct morphological types of lamina I neurons of the primate spinal cord. *J Neurosci*, 19:3545-3555.

Yu XH, Ribeiro-da-Silva A, De Koninck Y. (2005) Morphology and neurokinin 1 receptor expression of spinothalamic lamina I neurons in the rat spinal cord. *J Comp Neurol*, 491:56-68.

Zeitz KP, Guy N, Malmberg AB, Dirajlal S, Martin WJ, Sun L, Bonhaus DW, Stucky CL, Julius D, Basbaum AI. (2002) The 5-HT3 subtype of serotonin receptor contributes to nociceptive processing via a novel subset of myelinated and unmyelinated nociceptors. *J Neurosci*, 22:1010-1019.

Zhang ET, Han ZS, Craig AD. (1996) Morphological classes of spinothalamic lamina I neurons in the cat. *J Comp Neurol*, 367:537-549.

Zhang ET, Craig AD. (1997) Morphology and distribution of spinothalamic lamina I neurons in the monkey. *J Neurosci*, 17:3274-3284.

Zhang X, Nicholas AP, Hokfelt T. (1993) Ultrastructural studies on peptides in the dorsal horn of the spinal cord--I. Co-existence of galanin with other peptides in primary afferents in normal rats. *Neuroscience*, 57:365-384.

Zhang X, Bean AJ, Wiesenfeld-Hallin Z, Xu XJ, Hokfelt T. (1995a) Ultrastructural studies on peptides in the dorsal horn of the rat spinal cord--III. Effects of peripheral axotomy with special reference to galanin. *Neuroscience*, 64:893-915.

Zhang X, Nicholas AP, Hokfelt T. (1995b) Ultrastructural studies on peptides in the dorsal horn of the rat spinal cord--II. Co-existence of galanin with other peptides in local neurons. *Neuroscience*, 64:875-891.

11. Saját publikációk jegyzéke

A doktori értekezés alapját képező tudományos közlemények

Kozsurek M, Lukácsi E, Fekete Cs, Wittmann G, Réthelyi M, Puskár Z. (2007) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide (CART) is present in peptidergic C primary afferents and axons of excitatory interneurons with a possible role in nociception in the superficial laminae of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci*, 26:1624-1631.
IF: 3,673

Kozsurek M, Lukácsi E, Fekete Cs, Puskár Z. (2009) Non-selective innervation of lamina I projection neurons by cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide (CART) containing fibres in the rat spinal dorsal horn. *Eur J Neurosci* (közlésre elfogadva).
IF: 3,673 (2007)

Egyéb impakt faktorral rendelkező közlemények

Hajdú J, Marton T, Kozsurek M, Pete B, Csapó Z, Beke A, Papp Z. (2008) Prenatal diagnosis of abnormal course of umbilical vein and absent ductus venosus--report of three cases. *Fetal Diagn Ther*, 23:136-139.
IF: 0,844

Előadások, konferenciakiadványok

Kozsurek M, Lukácsi E, Fekete Cs, Puskár Z. Non-selective innervation of lamina I projection neurons by cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide containing fibers in the rat spinal cord. IBRO International Workshop 2008, Debrecen

Domos Gy, Pap K, Szőke Gy, Lukácsi E, Kozsurek M, Puskár Z. Neurochemical changes in the spinal dorsal horn in neuropathy following limb-lengthening in rabbits. IBRO International Workshop 2008, Debrecen

Kozsurek M, Lukácsi E, Fekete Cs, Réthelyi M, Puskár Z. The possible role of CART(55-102) peptide in excitatory neurotransmission in the spinal dorsal horn of rats. A Magyar Idegtudományi Társaság XII. Konferenciája, Szeged, 2007 (legjobb poszter díj)

Pap K, Szőke Gy, Shisha T, Oszwald E, Lukácsi E, Kozsurek M, Réthelyi M, Puskár Z. Morphological and peptide-expression changes in dorsal root ganglia in neuropathy following limb-lengthening in rabbits. A Magyar Idegtudományi Társaság XII. Konferenciája, Szeged, 2007

Kozsurek M, Wittmann G, Gerber G, Fekete Cs, Puskár Z. Origin and targets of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide immunoreactive fibers in lamina I of the rat spinal cord. Neuroscience 2006 Meeting, Atlanta, GA, USA, 54.16/Q5

Kozsurek M, Puskár Z, Geber G, Réthelyi M. μ-opioid-receptor expression of substantia gelatinosa neurons hyperpolarized by DAMGO. The Physiological Society: „The Study of Nociception from Periphery to Brain Stem" International Workshop, Kiev, Ukrajna, 2006

Puskár Z, Kozsurek M, Wittmann G, Fekete Cs. Origin and targets of cocaine-amphetamine regulated transcript peptide (CART) immunoreactive fibres in lamina I of the rat spinal cord. The Physiological Society: „The Study of Nociception from Periphery to Brain Stem" International Workshop, Kiev, Ukrajna, 2006

Kozsurek M, Wittmann G, Fekete Cs, Puskár Z. Subpopulations of CART immunoreactive fibres in the superficial laminae of the rat spinal cord. IBRO International Workshop 2006, Budapest

Kozsurek M, Puskár Z, Marosfői L, Gerber G, Réthelyi M. μ-opiod receptor expression of substantia gelatinosa neurons hyperpolarized by DAMGO. 5th International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiology, Stara Lesna, Szlovákia, 2005

Kozsurek M, Puskár Z, Marosfői L, Gerber G, Réthelyi M. DAMGO által hyperpolarizált substantia gelatinosa neuronok különböző mértékű μ-opioid receptor-1 expressziója patkány gerincvelőben. PhD. Tudományos Napok 2005, Semmelweis Egyetem, Budapest (1. díj)

Kozsurek M, Puskár Z, Marosfői L, Gerber G, Réthelyi M. μ-opiod receptor expression of substantia gelatinosa neurons hyperpolarized by DAMGO. A Magyar Idegtudományi Társaság XI. Konferenciája, Pécs, 2005 (legjobb poszter díj)

Kozsurek M, Gerber G, Randic M. Role of mGluRs in slow synaptic transmission in the rat spinal dorsal horn. IBRO International Workshop 2004, Budapest

12. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Puskár Zitának, aki időt és energiát nem kímélve, hihetetlen önzetlenséggel tanított és támogatott. Nélküle ez az értekezés soha nem készült volna el. Komplett metodikai ismereteket és szemléletmódot volt alkalmam ellesni Tőle. Egyenrangú partnerként kezelve vezetett be a pályázatok írásának, a kutatások saját erőből történő finanszírozásának rejtelmeibe. Sokszor hétvégéken és éjszakákon át dolgozott azért, hogy mindazon eredmények, melyeket az elmúlt években laborunkból kikerültek, megszülethessenek.

Köszönettel tartozom Dr. Majorossy Kálmán professzor úrnak, hogy 1998. májusában az anatómiai szigorlat után meghívott laborjába TDK hallgatónak, elindítva ezzel kutatói pályámon. Ugyancsak köszönet illeti őt azért, hogy házi opponensként dolgozatom áttanulmányozását és értékelését elvállalta. Köszönet az építő jellegű kritikáért, tanácsokért.

Köszönetet mondok Dr. Kiss Árpádnak. Személyisége meghatározó szerepet játszott abban, hogy medikus éveimtől kezdve mindvégig hű maradtam a kutatómunkához.

Köszönök mindent Dr. Réthelyi Miklós professzor úrnak! Bíztatására jelentkeztem Ph.D. képzésre. Nagy szerepe volt abban, hogy új kutatási területem a gerincvelői szintű nociceptív információfeldolgozás lett. Ph.D. tanulmányaim során bármilyen problémával nyugodtan fordulhattam hozzá. Köszönöm neki értekezésem áttanulmányozását, s a hozzá fűzött hasznos tanácsait, változtatási javaslatait. Köszönet illeti őt és Szabó Istvánné Marikát a doktori képzéssel kapcsolatos adminisztratív teendők bonyolításáért is.

Köszönet illeti másik témavezetőmet, Dr. Gerber Gábort is, aki Ph.D. tanulmányaim elején a fiziológiai vizsgálómódszerek világába vezetett be.

Köszönetet mondok Lukácsi Erika analitikusnak, a dolgozatomban szereplő elektronmikroszkópos képek az ő keze munkáját dicsérik. Köszönöm Horváth Péterné Terikének, hogy a legapróbb ügyes-bajos dolgokban is habozás nélkül segítségemre sietett, vagy feladataim egy részének átvállalásával tehermentesített.

Köszönöm Dr. Csillag András professzor úrnak, hogy doktori tanulmányaimat az általa vezetett Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetben fejezhettem be.

S végül, de nem utolsó sorban köszönetet mondok feleségemnek, Tímeának és fiamnak, Áronnak, hogy erőt meríthettem belőlük, hogy támogattak és elviseltek doktori értekezésem elkészítésének hónapjai alatt.