

# **Jegyzőkönyv**

dr. Kozsurek Márk

*„A CART peptid a gerincvelői szintű nociceptív  
információfeldolgozásban szerepet játszó neuronális  
hálózatokban”*

című doktori értekezésének házi védéséről

## Jegyzőkönyv

dr. Kozsurek Márk „*A CART peptid a gerincvelői szintű nociceptív információfeldolgozásban szerepet játszó neuronális hálózatokban*” című doktori értekezésének házi védéséről

A munkahelyi vita helyszíne: SE, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet könyvtára,  
időpontja: 2009. március 19., 10 óra

Jegyzőkönyvet vezeti: Dr. Várnainé Dr. Tóth Zsuzsanna, tudományos főmunkatárs

Mellékelve: házi opponensi vélemény és jelenléti ív két oldalon

Dr. Somogyi György köszönti a megjelenteket és átadja a szót dr. Kozsurek Márk doktorjelöltnek.

Doktorjelölt kb. 20-22 perces előadásban ismerteti témája irodalmi hátterét, célkitűzéseit, az alkalmazott módszereket, a kapott eredményeket, s az ezekből levonható következtetéseket.

Prof. Dr. Majorossy Kálmán, felkért házi opponens ismerteti az általa előzetesen áttanulmányozott dolgozattal és a megtartott prezentációval kapcsolatos észrevételeit, megjegyzéseit (mellékelve), és az írásbeli értékelésében megfogalmazott kérdések mellett további kérdésekre kér választ:

- a gerincvelő felületes laminái közül miért kapott az értekezésben a lamina I jóval nagyobb hangsúlyt, mint a lamina II,
- hogyan alakul a spinoparabrachialis és spinothalamicus projekció aránya és jelentősége a különböző fajokban,
- mennyire ismert a felületes laminákban található különböző sejtek morfológiai megjelenésének és funkciójának viszonya.

Doktorjelölt válaszol a munkahelyi vita előtt írásban kézhez kapott házi opponensi értékelésben megfogalmazott és az opponens által újonnan feltett kérdésekre. A válaszokat a házi opponens és a hallgatóság elfogadja.

Prof. Dr. Donáth Tibor tudománytörténetileg helyezi el a dolgozatot azáltal, hogy párhuzamot von a Knyihár és Csillik által a gerincvelőben az 1980-as években leírt fluorid-rezisztens alkalikus-foszfátáz jelölődés és a most ismertetett CART immunreaktivitás között.

Prof. Dr. Réthelyi Miklós, mint az Idegtudományi Doktori Iskola vezetője köszönetet mond Majorossy Professzor Úrnak, hogy az értekezés házi bírálatának elkészítését elvállalta. Elismerően nyilatkozik a doktorjelölt munkájáról, s hangsúlyozza, hogy a bemutatott eredmények önálló és hazai kutatásból származnak.

Prof. Dr. Fehér Erzsébet gratulál az értekezéshez. Felhívja a hallgatóság figyelmét, hogy az értekezés alapját két, az European Journal of Neuroscience-ben megjelent cikk képezi, s ez egyértelműen az Anatómiai Intézet hírnevét öregbíti. Javasolja, hogy az angol terminológia helyett a doktorjelölt, aki egyben anatómus is, a hivatalos anatómiai nomenklatúrát használja, pl. DRG helyett ganglion spinale. Ugyancsak javasolja, hogy a védés során az eredmények didaktikusabban, pontokba szedve szerepeljenek.

Prof. Dr. Csillag András, intézetvezető szintén elismerően nyilatkozik az értekezésről, s a házi opponenshez csatlakozva maximálisan támogatja a dolgozat doktori értekezésésként történő benyújtását.

További kérdés a doktorjelölthöz nem lévén, Dr. Somogyi György a házi védést berekeszti.

Budapest, 2009. március 19.

Dr. Tóth Zsuzsanna

## **Vélemény Dr. Kozsurek Márk "A CART peptid a gerincvelői szintű nociceptív információfeldolgozásban szerepet játszó neuronális hálózatokban" című doktori értekezéséről**

Szerző 102 oldalon számol be magas színvonalú morfológiai és fiziológiai jelentőségű kísérletes vizsgálatairól a CART peptid gerincvelői neuronális hálózatok nociceptív információfeldolgozásában játszott szerepére vonatkozóan.

A téma aktuális mert a fájdalom mindig a tudomány és az emberiség látóterében van, és a CART peptid számos lehetőséget feltáró szerepe az érdeklődés középpontjában áll, jelentősége növekedni fog. A célnak megfelelő legmodernebb kísérleti módszerek, és vegyszerek, feldolgozások, értékelések és prezentációjuk 27, zömében színes összetett ábrában és 4 táblázatban kifogástalan, látványos és jól áttekinthető. A bőséges irodalom sűrűn és korrektül kezelt. A dolgozat stilisztikailag kifogástalan, helyenként kifejezetten olvasmányos a sok szám, százalék és rövidítés ellenére, ami a világos táblázatok érdeme is. Végighúzódik az értekezés fejezetein egy előrehaladási irányvonal, ami összeköti a célokat az elérhetőséget jelentő adekvát módszerekkel, amelyek az elért eredményeket biztosítják és összevetésre nyújtanak lehetőséget. A szakmai és idegen kifejezések írásmódja majdnem egységes, elütés alig van (ceruzával jelöltem), és nyelve intelligens magyar. Az értekezés Tartalomjegyzék, Rövidítésjegyzék, Bevezetés, Célkitűzések, Módszerek, Eredmények, Megbeszélés, Következtetések, Összefoglalásra (magyar és angol nyelven) tagolódik melyet 33 oldalon irodalomjegyzék és saját közlemények jegyzéke követ.

### **Bevezetés**

Arányaiban kissé túlméretezett (30%), azonban tagolódása megfelelő, mert először a szenzoros és nociceptív információ útjait követi a receptortól a spinalis ganglionon keresztül a gerincvelőig, majd a hátsó szarv neuronális szerveződésében kiemelt jelentőségű felületes laminák (lamina I-II) interneuron és projektív sejtjeinek morfológiai, fiziológiai és neurokémiai eltérő sajátságait ismerteti. Itt végződnek a nociceptív információt szállító vékony A $\delta$  és C rostok, és ezen laminák sejtjeiből indulnak a fájdalmas stimulusokat továbbító felszálló rostok, patkányban leginkább a lateralis parabrachialis area és a caudalis ventrolateralis medulla felé. Rövid, de rendkívül informatív klinikai vonatkozások után a CART gén történetét ismerteti a peptidekig 2008-cal bezárólag. A CART peptidek által szabályozott széles spektrumú élettani folyamatok ismertetését követően a CART nocicepcióban betöltött szerepére utaló irodalmi adatok és összefüggések zárják a fejezetet.

### **Célkitűzés**

Mivel a gerincvelő egyes szegmentumai funkcionálisan jelentős különbséget mutatnak, és a CART-immunreaktív struktúrákat a gerincvelő teljes hosszában csak egérben írták le, és patkányban csak a cervicalis és thoracalis segmentumokat, első lépésben a CART immunfestődést a patkány gerincvelő teljes hosszában meg kívánták vizsgálni.

Céljuk volt megállapítani, hogy a patkány gerincvelő hátsó szarvának felületes lamináiban koncentrálnak, erősen CART immunpozitív fonat rostjai honnan származnak: primer afferens, lokális interneuron vagy leszálló pálya eredetűek-e, és ha igen, azok mely altípusaihoz tartoznak.

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

Mivel a CART immunpozitív rostok legsűrűbben a lamina I területen vannak jelen, s mert ugyanitt található az a projekciós sejtek, melyek a nonciceptív információt a 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. A CART peptid nonciceptív információfeldolgozásra gyakorolt hatásait viselkedési vizsgálatok támasztották alá. Ugyanakkor ismeretlen volt, hogy mindez pontosan hogyan történik és milyen kapcsolatrendszeren keresztül illeszkedik a CART peptid a gerincvelő fájdalmas stimulusokat fogadó, feldolgozó és továbbító neuronhálózatainak működésébe.

## Módszer

A kísérleti állatok 280-320 g tömegű hím Wistar patkányok. A módszerek ismertetése az egymást követő eljárások sorrendjében történik.

A CART peptid gerincvelői megoszlásának vizsgálatát egérből származó CART ellenanyaggal végezték az előírások szerint és a szkenneléshez konfokális lézerpásztázó rendszerrel felszerelt mikroszkópot használtak.

*Többes immunfluoreszcens festések.* A CART peptid tartalmú rostok eredetének meghatározásához először szelektíven jelölték a A $\delta$  rostokat kipreparált, átmetszett nervus ischiadicust használva, majd 3 nap után a jelölt és intakt állatokból is származó metszeteken többes immunhisztokémiai reakciókat végeztek, primer afferensekre, lokális interneuronokra és leszálló pályákra jellemző markerekkel az előírások szerint. A kolokalizációs analízisekhez a Neurolucida for Confocal 4.34 szoftvert használták.

*A primer afferensek neuropeptid tartalma.* A CART peptid, CGRP, SP és galanin kolokalizációjának vizsgálata a lamina I- ben egérben termelt CART antitestet, kecske CGRP ellenanyagot, patkány anti-SP ellenanyagot és nyúlban termelt GAL ellenes antitestet tartalmazott az elegy. Az analízishez Neurolucid for Confocal 4.34 szoftvert használták.

A gerincvelő felületes lamináiban végződő CART-immunreaktív terminálisok elektronmikroszkópos vizsgálatát CART peptid ellenes antitestekkel és immunperoxidáz reakcióval vagy monoklonális CART peptid ellenes antitesttel és ezüst intenzifikált arany reakcióval történt az előírások szerint.

*CART-immunreaktív rostok végződése a lamina I különböző morfológiájú és neurokémiaiájú projekciós sejteiben.* A lamina I-ben elhelyezkedő projekciós sejteket retrográd jelölték sztereotaxiás módszerrel a lateralis parabrachialis areába injektált CTb segítségével. 7 nap múlva HRP konjugált kecskeellenes antitesttel inkubálták, kromogénnek diaminobenzidint használtak az előírások szerint. A metszeteket CART ellenes, egérben termelt antitestet, nyúlban termelt NK1R ellenanyagot, tengerimalacban termelt anti CGRP és kecske CTb antitestet tartalmazó primer eleggyel kezelték az előírások szerint. 32 fuziform, 33 piramidális és 31 multipoláris NK1R-immunpozitív valamint 15 NK1R-t nem exprimált projekciós (CTb vel jelölt) neuronról, azok teljes térbeli nyúlványrendszeréről sorozatfelvételt készítettek és a konfokális Neurolucida for Confocal 4.34 szoftvercsomag NeuroExplorer 3.30 moduljával rekonstruálták a dendriten és szómán végződő CART ill. CGRP immunreaktív terminálisok felszíni sűrűségét.

## Eredmények

*A CART peptid gerincvelői megoszlása patkányban.* Összhangban a korábbi vizsgálatokkal patkányban is a CART festődést a cervicalistól a sacralis szegmentumig lehetett követni. A legintenzívebb volt a gerincvelő felületes lamináiban a rost és terminális festődés. Jelentős volt a festődés a dorsolateralis kötegben, beleértve a lateralis spinalis magot is, a canalis centralis körül és a thoracalis szegmentumokban az intermediolateralis magban.

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

A lamina I-ben a CART-pozitív axonok többsége (72%-a) míg a lamina II-ben kisebb hányada (34%) volt CGRP immunreaktív. A CART terminálisok 62%-a ill. 33%-a tartalmazott egyidejűleg CGRP-t és SP-t is a lamina I ill. II-ben. Csak kevés CART-erg végződés exprimált egyszerre CGRP-t és SOM-t (9,8% és 0,9%) a lamina I és II-ben. IB4 kötődés alapján azonosított nem peptiderg primer afferens terminálisokban CART nem volt jelen. A nervus ischiadicusba adott CTb hasonló megoszlásban jelölte a gerincvelőben végződő velőshüvelyes rostokat (jelentősen csak az Adelta rostokat) mint ahogy arról korábban mások beszámoltak. A CTb és a CART között nem találtak kolokalizációt. A CART terminálisok fele (57%) és (48%) a lamina I és a II területén exprimálta a VGLUT2 glutamát transzportert. A CART-erg végződések kis hányadát (2,42% és 6,75%) exprimálta csak a gátló interneuronmarker VGAT GABA transzportert, míg a GLYT2 glicin transzporterrel nem volt kolokalizáció. A CART peptidet és VGUT2-t egyaránt tartalmazó, de CGRP-t nem exprimáló serkentő interneuronokhoz tartozó terminálisok 17%-a és 33%-a volt SP pozitív a lamina I ill. II-ben, valamint ugyanott 15% és 25% volt SOM-immunreaktív. Az NT jelölt CART-erg terminálisok száma elenyésző volt (3% és 3%). Megfigyelésük szerint a felületes laminákban a CART peptid nem kolokalizált a leszálló pályákra jellemző markerekkel, sem az 5-HTT transzporterrel sem a noradrenerg végződésekben található dopamin- $\beta$ -hidrolázzal. A hátsó gyöki ganglionokból készült metszetekben kevés (10% alatti) CART peptidet exprimáló sejtet és rostot láttak. A CART pozitív sejtek a kis sejtekhez tartoztak és többségükben CGRP-t és SP-t is tartalmaztak. Találtak olyan idegsejteket is melyekben CART mellett sem CGRP, sem SP nem volt jelen.

*A CART peptid előfordulási gyakorisága a primer afferensekben valamint a CART peptid és a GAL kolokalizációja a lamina I. ben.* A horizontális metszetekben a lamina I területén a CART-erg végződések többsége (79%) exprimált CGRP-t. A CGRP-immunreaktív terminálisok csaknem mindegyike SP pozitív (97%) volt és a CART peptid a CGRP/SP immunpozitív végződések 49%-ában volt jelen. CGRP/SP tartalmú boutonok többsége (81%) GAL pozitív volt és a CGRP/SP/GAL pozitív terminálisok fele (51%) tartalmazta a CART peptidet. A CART és CGRP-t együttesen exprimáló terminálisok jórésze (72%) GAL pozitívnak bizonyult, míg a CART immunreaktív terminálisoknak csak kis hányada volt egyidejűleg GAL és CGRP negatív.

*Elektronmikroszkópos vizsgálatok.* A CART immunreaktív terminálisok szinaptikus kapcsolatainak feltárására irányult ultravékony metszetekben 25-30 bouton követve. DAB reakcióval az antitestek jó penetrációja lehetővé tette a jelölt boutonok hosszabb sorozatmetszeten való követését. A 25-ből 24 CART-erg axon aszimmetrikus szinapszissal végződött valamely neuron dendritjén, ill. szómáján, de mivel a kromogén kitöltötte teljesen, nem lehetett megállapítani a profil más jelölt vagy jelöletlen axonhoz való viszonyát. Az ezüst-intenzifikált arany technika diszkrét megjelenésével nem fedi a jelölt axon ultrastruktúráját, viszont a szekunder antitíest a hozzákötött kolloidális arany miatt rosszul penetrál, és röviden biztosítja a jelölt terminális követhetőségét. 30-ból 10 jelölt terminális szinapszissal végződött valamely dendriten a többi jelölt axonvégződés szorosan feküdt hozzá más jelölt vagy jelöletlen axonhoz, de axoaxonikus szinapszis nem volt látható.

## Következtetések

Kutatási eredményeik a CART peptid gerincvelői szintű nociceptív információfeldolgozásban betöltött szerepének, anatómiai alapjainak, megismeréséhez járulnak hozzá. A CART peptid nagy mennyiségben van jelen a gerincvelő teljes hosszában a hátsó szarv felületes lamináiban, melyek a fájdalmas ingerek feldolgozásának kiemelt jelentőségei. A CART a lamina I területen végződő CGRP/SP tartalmú nociceptívnek tartott peptiderg C primer afferensek egy jelentős részében megtalálható. A CART jelentős mértékű kolokalizációt mutat a galaninnal, melyet a krónikus fájdalom szindrómákban az egyik legfontosabb szerepet játszó peptidnek

tartanak. A CART-erg rostok közvetlenül végződnek a lamina I projekciós neuronjain, melyen többségükben nociceptív információt továbbítanak a supraspinalis területek felé.

További vizsgálatok szükségesek annak megválaszolására, hogy a NMDA glutamáterg transzmissziót potencírozó CART peptid képes-e befolyásolni a lamina I neuronjain kialakuló LTP-t, s úgy szerepe lehet-e a krónikus fájdalom kialakításában vagy fenntartásában. Ugyancsak indokolt annak tanulmányozása, milyen módon lép interakcióba a CART a napjainkban leghatékonyabbnak tartott fájdalomcsillapítókkal, az opiátokkal. A CART nocicepcióban betöltött szerepének tisztázásához nagy mértékben 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.

## Megbeszélés

A megbeszélés értékes összehasonlítása a saját eredmények irodalomban szereplő eredményekkel, és kölcsönös elhelyezkedés, mely új célok kitűzéséhez vezet.

## Összefoglalás

Az opponens feladatának megfelelően néhány kérdésre várok szóbeli választ.

40. o.: Mi a különbség a glomerulusba lépő specifikus afferens és a szóló axonterminálist létesítő lehetőségei között?

44. o.: Nyilvánvalóan várható volt, mert különben nem csináltatok volna, hogyan magyarázzuk a leszálló pályák jelölődési hiányát, vagy a várhatóságát. És a IB4, GLYT2, CTb?

45. o.: Mi a csak CART pozitív kis ganglionsejtek centrális nyúlványainak a sorsa a lamina I-II-ben?

50.-51.o.: Hány fajta neuron létezik a lamina I-II-ben morfológiai jelek alapján?

A fentieket összefoglalva szerző célkitűzéseit teljesítette, és értékes új eredményeivel a CART peptid nocicepcióban betöltött szerepének tisztázásához nagymértékben járult hozzá. Az értekezés beadását messzemenően támogatásra javaslom.

Dr. Majorossy Kálmán