

# **EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

## **Az endokannabinoid és kolinerg neuromodulációs mechanizmusok vizsgálata az egér nucleus pedunculo-pontinus neuronjain és asztrocitáin**

**Kovács Adrienn**

**Témavezető: Dr. Pál Balázs Zoltán**



**DEBRECENI EGYETEM**

**Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola**

**Debrecen, 2015**

## Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék .....	- 4 -
Kulcsszavak .....	- 7 -
Bevezetés.....	- 8 -
1. A központi idegrendszer kolinerg területei .....	- 8 -
2. A nucleus pedunculopontinus (PPN) morfológiai és funkcionális sajátosságai .....	- 9 -
3. A kannabinoid szignalizáció.....	- 14 -
3. 1. A kannabinoidok típusai, receptorai, hatásmechanizmusai.....	- 14 -
3.2. Az endokannabinoidok élettani szerepe a központi idegrendszerben .....	- 16 -
4. Az asztrociták főbb sajátosságai és funkciói .....	- 20 -
4. 1. Az asztrociták fiziológias folyamatokban betöltött szerepe.....	- 21 -
4. 2. Az asztrociták $Ca^{2+}$ szignalizációja és „excitabilitása” .....	- 23 -
4. 3. Gliotranszmisszió .....	- 25 -
Célkitűzések.....	- 28 -
Anyagok és módszerek.....	- 29 -
1. Oldatok .....	- 29 -
2. Kísérleti állatok .....	- 29 -
3. Túlélő agyszelet preparálása .....	- 30 -
4. Elektrofiziológia .....	- 30 -
5. Alkalmazott szerek .....	- 31 -
6. Intracelluláris $Ca^{2+}$ koncentráció mérése .....	- 32 -
7. A jelölt neuron láthatóvá tétele .....	- 33 -
8. Immunhisztokémia.....	- 34 -
9. Statisztikai analízis.....	- 36 -
Eredmények.....	- 37 -
1. A CB1 receptor aktivációja heterogén választ váltott ki a PPN neuronjaiból.....	- 37 -
2. A CB1 receptor aktivációja megváltoztatja az asztrociták $Ca^{2+}$ hullám frekvenciáját .....	- 41 -
3. A neuronális membránpotenciál-változásokért az asztrociták CB1 receptoron keresztüli aktivációja felelős .....	- 44 -
4. A CB1 agonisták hatása függ a neuronok és asztrociták nyugalmi aktivitásától .....	- 47 -
5. A kolinerg és endokannabinoid hatások átfednek a PPN neuronjain .....	- 51 -
Megbeszélés .....	- 56 -
1. Az asztrociták CB1 receptorának aktivációja modulálja a PPN neuronjainak tevékenységét....	- 56 -

2. Az mGluR-ok szerepe a neuron-glia jelátvitelben .....	- 58 -
3. A kolinerg és kannabinoid agonisták hatásainak átfedése a PPN neuronjain.....	- 61 -
3. 1. A neuronális depolarizáció lehetséges okai .....	- 61 -
3. 2. A neuronok válasziányának háttere .....	- 62 -
3. 3. A neuronális hiperpolarizáció háttere .....	- 63 -
4. A PPN endokannabinoid modulációja és az alvás-ébrenlét szabályozása.....	- 63 -
Összefoglalás .....	- 67 -
Summary .....	- 68 -
Irodalomjegyzék .....	- 69 -
Közlemények listája .....	- 86 -
Köszönetnyilvánítás.....	- 88 -

## Rövidítésjegyzék

2-AG	2-arachidonoilglicerol
5-HT <sub>2</sub>	5-hidroxitriptamin
AC	adenilát-cikláz
ACEA	(5Z,8Z,11Z,14Z)-N-(2-kloroetil)ikoza-5,8,11,14-tetraenamid
aCSF	mesterséges agyfolyadék (artificial cerebrospinal fluid)
AM	acetoxi metilészter
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolpropionsav
ANT	anadamid membrántranszporter
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
BAPTA	1,2-bis(o-aminofenoxi)etán-N,N,N',N'-tetraecetsav
BDNF	"brain derived neurotrophic factor"
cAMP	ciklikus adenzin monofoszfát
ChAT	kolin acetiltranszferáz (choline acetyltransferase)
CPCCOEt	7-(hidroxi-imino) ciklopropa[b]króm-n-1a-karboxilát-etil-észter
D-AP <sub>5</sub>	D-2-amino-5-foszfopentanoát
DB	Broca-féle diagonális szalag
DGL $\alpha$	diacilglicerol lipáz $\alpha$
DMSO	dimetil szulfoxid (dimethyl sulfoxide)
DSE	depolarization-induced suppression of excitatory
DSI	depolarization-induced suppression of inhibition
EAAT	serkentő aminosav transzporter (excitatory amino acid transporter)
eCB	endocannabinoid
EGTA	etilén glikol tetraecetsav (ethylene glycol tetraacetic acid)
EPSC	excitatórikus posztzinaptikus áram (excitatory postsynaptic current)
FAAH	zsírsav-amid hidroláz (fatty acid amidohydrolase)
GABA	gamma-amino-vajsav
GAD	glutamát dekarboxiláz (glutamic acid decarboxylase)
GIRK	G-fehérje kapcsolt befelé egyenirányító K <sup>+</sup> csatorna (G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel)
GFAP	"glial fibrillary acidic protein"
GLAST-1	L-glutamát/aszpartát transzporter
GLT-1	gliális L-glutamát transzporter

GPCR (GPR)	G-fehérje kapcsolt receptor (G protein –coupled receptor)
GPI	globus pallidus pars interna
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-piperazinétánszulfonsav,(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
IL-1	interleukin 1
IP3	inozitol 1,4,5-trifoszfát
IPSC	inhibitorikus posztszinaptikus áram (inhibitory postsynaptic current)
LDT	nucleus laterodorsalis tegmentalis (laterodorsal tegmental nucleus)
LTD	hosszú távú depresszió (long-term depression)
LTP	hosszú távú potencírozás (long-term potentiation)
MAP	mitogén aktivált protein
MGL	monoacilglicerol-lipáz
mGluR I	I-es csoportú metabotróp glutamát receptor
mGluR II	II-es csoportú metabotróp glutamát receptor
mIPSC	miniatűr inhibitorikus posztszinaptikus áram (inhibitory postsynaptic current)
MPEP	2-metil-6-(feniletinil)piridin
MS	mediális septum
nAChr	nikotinos actilkolin receptor
NAPE	N-arachidonil-foszfadiletanolamin
NAPE PLD	N-acil-foszfadiletanolamin- hidrolizáló foszfolipáz-D
NAT	N-aciltranszferáz
nBM	nucleus bazális magnocelluláris
NBQX	2,3- dihidroxi-6-nitro -7-szulfamoil-benzo[f]kinoxalin-2,3-dion, (2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl benzo[f]quinoxaline-2,3dione)
NMDA	N-metil-D-aspartát
OGB	Oregon Green BAPTA-1 AM
P2X	purinerg 2-es típusú receptor
PBS	foszfát puffer só (phosphate-buffered saline)
PFA	paraformaldehid (paraformaldehyde)
PE	foszfadiletanolamin
PIP2	foszfadilinozitol 4,5-biszfoszfát
PLC	foszfolipáz C
PPN	nucleus pedunculopontinus (pedunculopontine nucleus)
PPNc	nucleus pedunculopontinus (pedunculopontine nucleus) pars compacta

PPNd	nucleus pedunculo pontinus (pedunculo pontine nucleus) pars dissipatus
RAS	retikuláris aktivációs rendszer (reticular activating system)
REM	gyors szemmozgás (rapid eye movement)
RMP	nyugalmi membránpotenciál (resting membrane potential)
ROI	”region of interest”
SERCA	szarko/endoplazmatikus retikulum $Ca^{2+}$ ATPáz (sarco/endoplasmic reticulum $Ca^{2+}$ -ATPase)
SIC	lassú befelé irányuló áram (slow inward current)
SN	substantia nigra
SNr	substantia nigra pars reticulata
SOC	lassú kifelé irányuló áram (slow outward current)
STN	nucleus subthalamicus (subthalamic nucleus)
TASK	„TWIK (two pore domain weak inward rectifying potassium channel) related acid sensitive potassium channel”
TBS	tris puffer só
TNF $\alpha$	tumor nekrosis faktor $\alpha$
TRPV1	1-es típusú tranziens receptor potential vanilloid csatorna
TTX	tetrodotoxin
VGCC	feszültségfüggő $Ca^{2+}$ csatorna (voltage-gated $Ca^{2+}$ channels)
VSOR	térfogat érzékeny kifelé irányuló anioncsatorna (volume-sensitive outwardly rectifying)
VTA	ventralis tegmentális area
WIN55,212-2	(R)-(+)-[2,3-dihidro-5-metil-3[(4-morfolinil)metil]pyrroló [1,2,3-de]-1,4-benzoxazinil]-(1-naftalenil)methanone mesylat

## **Kulcsszavak**

Nucleus pedunculo pontinus, CB1 receptor, neuromoduláció, asztrocita, metabotrop glutamát receptor, karbakol, muszkarinerg, retikuláris aktivációs rendszer

## **Keywords**

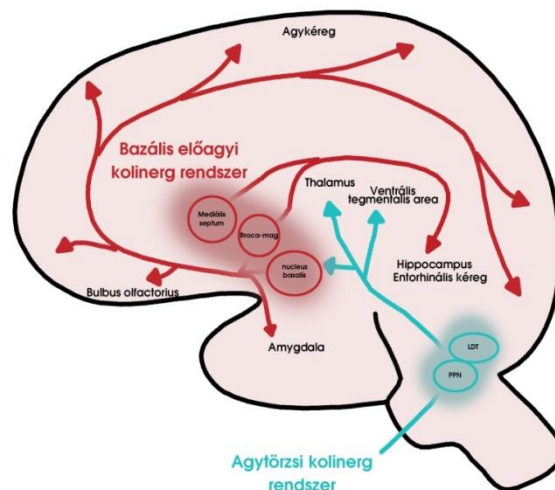
Pedunculopontine nucleus, CB1 receptor, Neuromodulation, Astrocyte, Metabotropic glutamate receptor, carbachol, muscarinic, reticular activating system

## Bevezetés

### 1. A központi idegrendszer kolinerg területei

Az emlősök kolinerg rendszere több régiót is magába foglal, amelyek a Ch1-Ch6-os csoportokba sorolhatók be. A bazális előagy kolinerg projekciós neuronjai a Ch1-Ch4 régiókat alkotják, melyek a mediális septumban, a Broca-magban, a nucleus basalisban (Meynert-féle mag) helyezkednek el, és ezek a kérgi és hippocampalis területek fő kolinerg forrásai. A nucleus pedunculopontinus (PPN) projekciós neuronjaival (Ch5) együtt a nucleus laterodorsalis tegmentalis neuronjai (Ch6) főként a thalamus, a formatio reticularis, valamint a ventralis tegmentalis area (VTA) és a substantia nigra területét látják el kolinerg projekciókkal (Mesulam és mtsai., 1983), melyet az 1. ábrán szemléltettünk. A nucleus laterodorsalis tegmentalis a PPN számára is biztosít kolinerg bemenetet.

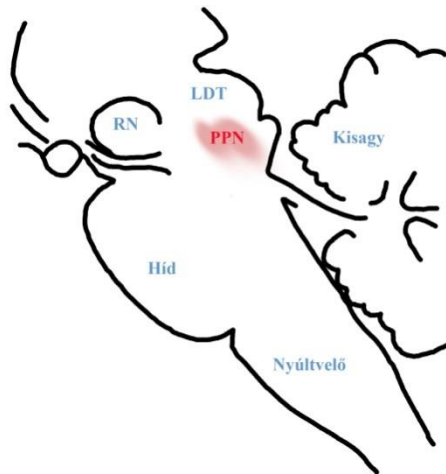
A kolinerg neuromoduláció több központi idegrendszeri működésben tölt be fontos szerepet: az alvás-ébrenlét, a tanulás és figyelem folyamatának szabályozásához járul hozzá (Id. Woolf és Butcher 2011). A továbbiakban a kolinerg magvak közül a nucleus pedunculopontinussal kívánok részletesebben foglalkozni.



1. ábra. A főbb kolinerg projekciók hálózata a központi idegrendszerben. A kolinerg magvakat 2 fő csoportra osztjuk: bazális előagyi kolinerg rendszer és az agytörzsi kolinerg rendszer. A bazális előagyi kolinerg rendszer magába foglalja a mediális septumot (MS), a diagonális szalag (DB) vertikális és horizontális ágait (Broca-mag) valamint a nucleus basalis magnocellularis-t (nBM). A DB és az nBM horizontális ága gazdagon projiciál az agykéreg, bazolaterális amygdala és a bulbus olfactorius területeire. Az MS és a DB vertikális része a hippocampust ill. az entorhinális kérget látják el kolinerg bemenetekkel. Az agytörzsi kolinerg rendszer magába foglalja a nucleus pedunculopontinust (PPN) és a nucleus laterodorsalis tegmentalist (LDT), melyek főként szubkortikális struktúrákba projiciálnak (Newman és mtsai., 2012 alapján).

## 2. A nucleus pedunculopontinus (PPN) morfológiai és funkcionális sajátosságai

A PPN a pontomesencephalicus tegmentumban található, és anatómiai elhelyezkedését tekintve caudalisan a nucleus parabrachialis, mediálisan a pedunculus cerebellaris superior, laterálisan a lemniscus lateralis, dorzálisan pedig a substantia nigra, nucleus cuneiformis és subcuneiformis határolja (2. ábra; **Benarroch, 2013**).



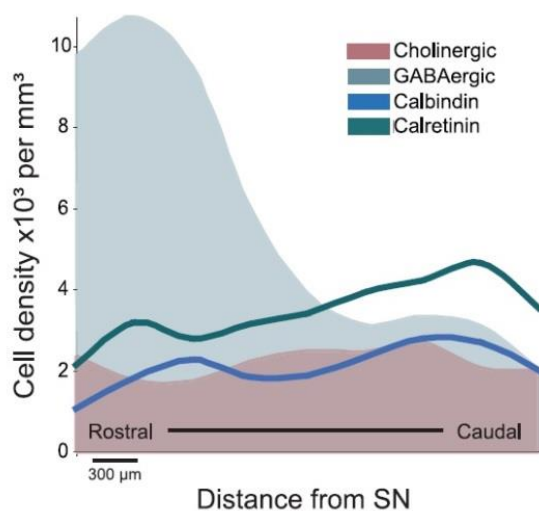
2. ábra. A nucleus pedunculopontinus pozíciója emberi agytörzsben. RN = nucleus ruber, PPN = nucleus pedunculopontinus, LDT = nucleus laterodorsalis tegmentalis (**Jenkinson és mtsai., 2009**; módosítva).

A PPN-nek szerepe van szenzoros, motoros és kognitív funkciók kialakításában; fő funkciói közé sorolható a mozgásszabályozás, ezen kívül az alvás-ébrenlét fázisának szabályozása, és a startle reflex prepulzus gátlásában való részvétel (**Id. Garcia-Rill, 1991, 2011; Reese és mtsai., 1995; Janzen és mtsai., 2012**).

A PPN érintettségét számos kórélettani folyamatban is kimutatták. Mind a PPN teljes pusztulása, mind a neuronok számának a csökkenése összefüggésben állhat bizonyos neurológiai, neuropszichiátriai megbetegedésekkel, mint pl. peduncularis hallucinózis, skizofrénia, valamint a vizuális hallucinációkkal járó Parkinson-kór (**Benke, 2000; Garcia-Rill, 1991; 2011; Janzen és mtsai., 2012**). A Parkinson-kór terápiájaként végzett mély agyi stimuláció egyik lehetséges célpontjaként is felmerült a PPN (**Pereira és mtsai., 2012**).

A PPN kolinerg és nem-kolinerg (GABAerg, glutamaterg) neuronokból épül fel (**Benarroch, 2013; Martinez-Gonzalez és mtsai., 2011**). A PPN kolinerg és nem-kolinerg neuronjainak aránya a magon belül változik, mely nagyban függ azok rostrocaudalis pozíciójától (3. ábra). A PPN alapvetően két fő részre osztható, az egyik a *pars compacta* (PPNc), a másik a *pars dissipata* (PPNd). A PPNc caudalisan található és többnyire nagy

sejtekből épül fel, amelyek sűrűn fordulnak elő a mag dorso-lateralis részén. A PPNd a mag rostrocaudalis tengelye mentén rostralisabban helyezkedik el, és főként kisebb és közepes sejtekből épül fel, a brachium conjunctivum rostjai és a centralis tegmentalis tractus régiója között. A humán PPNc magban található neuronok 80-90%-a kolin acetiltransferáz (ChAT) pozitivitást mutat. Ezzel szemben a PPNd neuronjainak kisebb százaléka ChAT-pozitív, itt 25-75% között volt a kolinerg sejtek száma (3. ábra; **Olszewski és Baxter, 1982; Mena-Segovia és mtsai., 2009; Id. Jenkinson és mtsai., 2009; Martinez-Gonzalez és mtsai., 2011**).



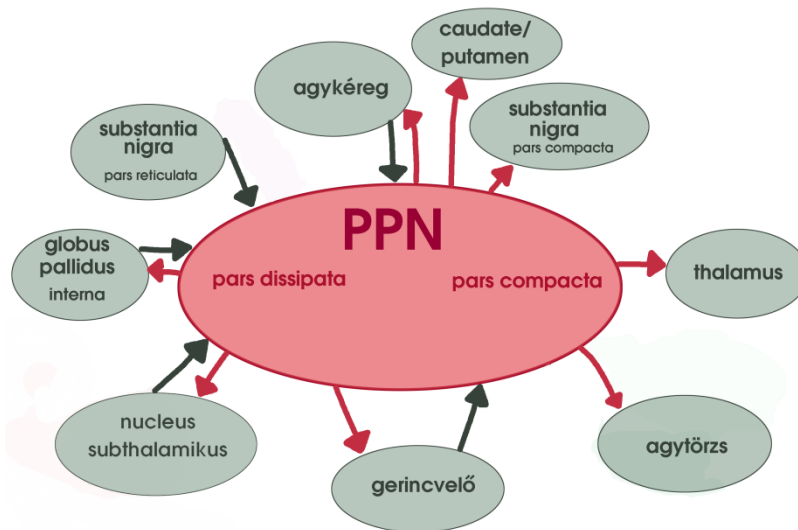
3. ábra. A különböző típusú neuronok eloszlása a PPN-ben. A GABAerg neuronok főként a PPN rostralis részén lokalizálódnak, míg a kolinerg neuronok elsősorban a PPN caudalis régiójában fordulnak elő nagyobb arányban. A calbindin és calretinin kalciumkötő fehérjék megoszlása is rostrocaudalis gradienst mutat. A GABAerg sejtek aránya a mag rostralis részén jelentősen megnő. Mint ahogy az ábrán is látszik, a PPN rostralis része mutatja a legnagyobb sejtdenzitást. SN=substantia nigra (**Martinez-Gonzalez és mtsai., 2011**).

A PPN-ben megtalálható kolinerg sejtek morfológiáját több fajban (patkányban, macskában, majomban és emberben) is vizsgálták. Kimutatták, hogy a kolinerg sejtek szómájának mérete inkább közepes (kb. 20-30 µm), de előfordulnak kifejezetten nagy méretűek is (60-80 µm); attól függően, hogy mely régióban helyezkednek el. A szómák alakja szerint előfordul multipoláris, háromszögű, ovális és kerek sejt is. A régió kívül eső sejtek szómája jóval kerekesebb, mint a PPN-ben megtalálható sejtek. Megfigyeltek mind mielinizált, mind pedig mielinizálatlan axonnal rendelkező neuronokat is, bár a nem mielinizált axonok ritkábban fordultak elő (**Id. Reese és mtsai., 1995**).

A PPN neuronjai hosszú, elágazó axonokkal rendelkeznek, melyek az agy számos részével képeznek kapcsolatot. Így a PPN számos leszálló és felszálló projekció révén kapcsolatban áll a központi idegrendszerben számos agyterülettel. A PPN **felszálló projekciói** közé a colliculus superiorba, a substantia nigrába, a nucleus subthalamicusba, a lateralis hypothalamusba, a zona incertába, a globus pallidusba, a nucleus entopeduncularisba, a thalamusba, bazális előagyba és a frontális kéregbe küldött rostok tartoznak. A PPN-ből

küldött *leszálló projekciók* célpontjai közé tartozik a periaqueductalis szürkeállomány, a nucleus reticularis, nucleus raphe dorsalis, nucleus raphe intermedius, nucleus raphe magnus, a ventralis tegmentalis area és a gerincvelő (főleg a cervicalis szegmentumok; **Id. Garcia-Rill, 1991; Reese és mtsai., 1995; Steriade és mtsai., 1988; Id. Winn és mtsai., 2006**). A PPN kapcsolatainak jó része reciprok összeköttetés.

A PPN kapcsolatait a 4. ábra foglalja össze.



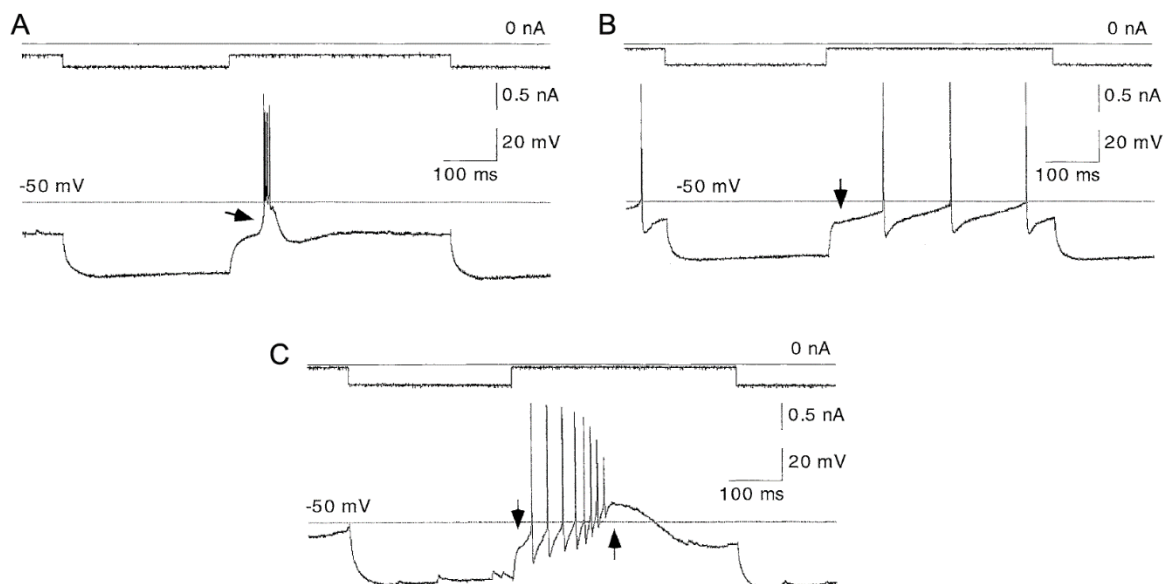
4. ábra. A PPN kapcsolatai más agyterületekkel (PPN = piros terület).

**Afferens rostok** (fekete nyilak): A PPN glutamaterg bemenetet a nucleus subthalamicusból és a kisagykéregből, GABAerg bemenetet a globus pallidusból és a substantia nigrából, valamint szenzoros bemeneteket a gerincvelőből kap. A substantia nigra és a globus pallidus rostjai főként a PPNd glutamaterg neuronjait látják el, míg a gerincvelő főként a PPNc kolinerg sejtjeit.

**Efferens rostok** (piros nyilak): a substantia nigrát, globus pallidust, agykérget, thalamust, nucleus caudatus/putament, gerincvelőt és agytörzset látják el bemenetekkel. A gerincvelőbe projiciáló neuronok főként a PPNd glutamaterg neuronjaitól származik. A thalamusba és agytörzsbe projiciáló rostok a PPN kolinerg neuronjaitól erednek.

A PPN sejtjeinek *membránsajátságait* tekintve a klasszikus leírás szerint 3 féle csoportot alkotnak (**Kang és Kitai, 1990; Leonard és Llinas, 1990, 1994; Id. Steriade and McCarley, 2005**). Az *I-es típusú sejt*ek spontán aktivitást nem mutatnak, de depolarizáló áramlépcsők hatására hosszú akcióspotenciál-sorozatot tüzelnek. Előzetes hiperpolarizációt követő depolarizáció hatására kalcium-mediált, TTX-re nem érzékeny konduktancia aktiválódik, és "burst" típusú tüzelés alakul ki. Ezen neuronok között nem fordult elő kolinerg neuron; valamennyien nem-kolinergnek (glutamaterg, GABAerg) bizonyultak (**Id. Jenkinson és mtsai., 2009; Reese és mtsai., 1995**). Az I-es típusú neuronok között találunk kisebb, ill. közepes nagyságú sejtet is, alakjukat tekintve pedig vannak orsó, és háromszög alakú sejt is. A dendritek száma ezeknél a sejtéknél 3-5 között van (**Id. Jenkinson és**

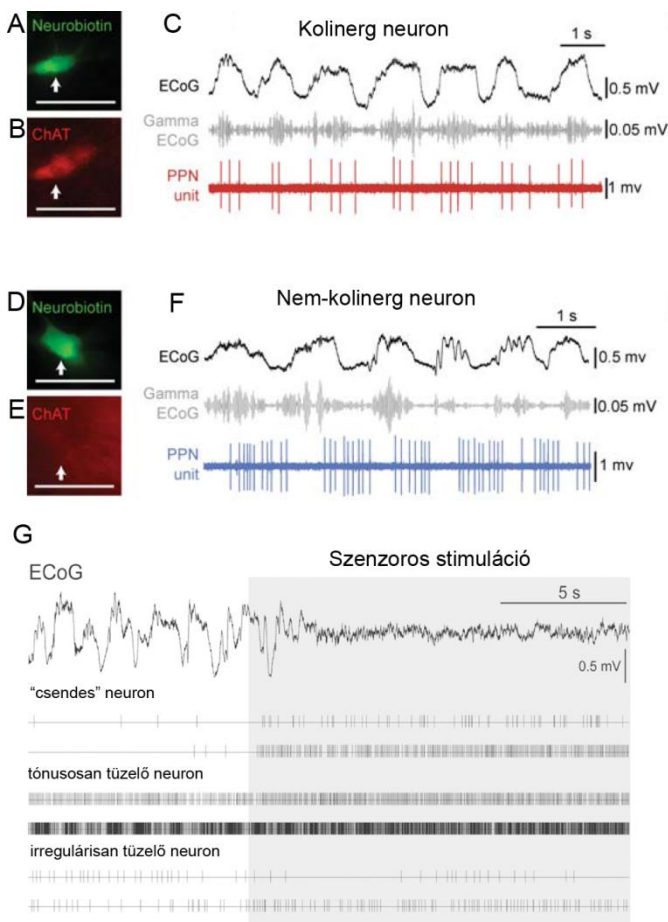
mtsai., 2009; Reese és mtsai., 1995). A *II-es típusú sejtek* tranziens  $K^+$  árammal (A-árammal) és a lassú kalciumárammal rendelkeznek. Egyes szerzők szerint viszont a II-es típusú sejtek egy alcsoportja csupán A-árammal rendelkezik, és az akciós potenciál tüzelésben nem játszik szerepet lassú kalciumáram (Takakusaki és mtsai., 1996; Id. Jenkinson és mtsai., 2009; Steriade és McCarley, 2005). A II-es csoportú sejtek csak A-árammal rendelkező alcsoportját egyes szerzők *III-as típusú sejtként* írják le (Kang és Kitai, 1990), míg mások nem is tesznek említést a III-as típusú sejtekről (Zitella és mtsai., 2013). A II-es típusú neuronok főként a PPN rostralis és középső részén találhatóak, spontánul is tüzelnek, és a „burst” típusú tüzelési mintázat mellett szabályos tüzelési mintázatot is mutathatnak. Hiperpolarizáló impulzus adása után a membránpotenciáljuk lassabban tér vissza a kiindulási értékre. Nagy amplitúdójú és széles akciós potenciáljaik vannak, lassú utóhiperpolarizációval; továbbá küszöb alatti membránpotenciál-oscillációkkal. Ezen neuronok 50-92 %-a kolinerg sejt. A sejtek morfológiáját tekintve megfigyelték közöttük közepes, ill. nagyméretű sejteket is, alakjukat tekintve pedig többnyire poligonális alakúak, 5-7 dendrittel körülvéve. Mind az I-es és II-es típusú sejtek között találunk kisebb ( $<20 \mu\text{m}$ ) és nagyobb ( $35 \mu\text{m}$  feletti) méretű sejteket (Id. Jenkinson és mtsai., 2009; Id. Reese és mtsai., 1995; Kang és Kitai, 1990; Leonard és Llinas, 1990, 1994; Id. Steriade és McCarley, 2005; 5. ábra) A III-as típusú sejtek jelentős része ChAT negatív (közel 60%), bár sok kolinerg neuron is ide sorolható (Leonard és Llinas, 1994; Id. Steriade és McCarley, 2005).



5. ábra. A PPN neuronjainak membránsajátságai. A. I-es típusú sejt hiperpolarizáló áram impulzus hatására „burst” típusú tüzelést mutat. B. A II-es típusú sejtre jellemző hiperpolarizáció hatására kialakuló szabályos tüzelési mintázat, ami a depolarizáló impulzus kezdetéhez képest késéssel jelenik meg (nyíl). A késésben fontos szerepe van az A-áramnak. C. A II-es típusú sejtek másik csoportjára

jellemző mintázat melynek kialakításában az A-áram mellett szerepe van a kalcium áramnak is (l. nyílak; **Takakusaki és mtsai., 1996**).

Az egyes sejttípusok tüzelési mintázatának a kortikális EEG-vel mutatott korrelációi alapján is csoportosíthatóak a PPN neuronjai (**6. ábra; Mena-Segovia és mtsai., 2008; Ros és mtsai., 2010**). A kortikális lassú hullámú aktivitás aktív szakaszai alatt és a gamma-aktivitás alatt tüzel a kolinerg neuronok zöme. Egy kisebb populációjuk magas akcióspotenciál-tüzelési frekvenciát mutat (kb. 30 Hz), a lassú hullámú aktivitás passzív szakaszainak második felében tüzelnek és a gamma-oszcillációktól nem függ a tüzelési aktivitásuk. A nem-kolinerg (glutamaterg és GABAerg) neuronok ugyancsak több funkcionális csoportba oszthatóak az *in vivo* tüzelési aktivitásuk alapján: a "csendes" (spontánul nem vagy alig tüzelő), a tónusosan tüzelő és az irregulárisan tüzelő neuronokra. A "csendes" neuronok lassú hullámú kortikális aktivitás alatt nem vagy alig tüzelnek, míg a gamma-aktivitás alatt megemelkedik a tüzelési frekvenciájuk. A tónusos tüzelési mintázatot mutató neuronok aktivitása nem függ a kortikális aktivitástól, míg az irregulárisan tüzelő neuronok csökkenthetik vagy növelhetik is a tüzelési frekvenciájukat a kortikális gamma-aktivitással párhuzamosan (**Ros és mtsai., 2010**).



**6. ábra. A PPN kolinerg sejteji megnövelik aktivitásukat a kérgi lassú hullámú aktivitás és gamma oszcillációk alatt.**

**A-B.** Neurobiotinnel jelölt és ChAT pozitivitást mutató sejt képe. **C.** A kolinerg sejtek tüzelési mintázata a lassú hullámú aktivitás aktív komponensével és a gamma oszcillációkkal szinkronban történik (fekete=elektrokortikogram; szürke = gamma oszcilláció; piros = kolinerg sejt tüzelése). **D-E.** Neurobiotinnel jelölt és ChAT immunpozitivitást nem mutató nem-kolinerg sejt képe. **F.** A nem-kolinerg sejtek a lassú hullámú aktivitás passzív komponense alatt tüzelnek és tüzelési aktivitásuk a gamma oszcillációkkal nem mutat minden esetben összefüggést (fekete=elektrokortikogram; szürke=gamma oszcilláció; kék=nem-kolinerg sejt tüzelése). Kalibrációs egyenes: 50  $\mu$ m (**Mena-Segovia és mtsai., 2008**). **G.** A PPN nem-kolinerg neuronjainak tüzelési mintázata a lassú hullámú aktivitás és szenzoros stimuláció hatásárebekövetkező deszinkronizáció alatt (**Ros és mtsai., 2010**).

A PPN-ben található sejtekből különféle neurotranszmitter, neuropeptid szabadulhat fel az acetilkolinon, glutamát és GABA-n kívül, így például urotenzin II, opioidok, noradrenalin, szerotonin és dopamin. A kolinerg neuronok képesek több transzmittert koexpresszálni, mint a glutamát, GABA, nitrogén-monoxid, valamint neuropeptideket mint a P-anyag (ld. **Jenkinson és mtsai., 2009**). A PPN sejtjeire jellemző membránreceptorok között leírták az NMDA (n-metil-d-aszpartát), az M2, M3 és M4-es muszkarin típusú receptorokat mind a PPN, mind pedig az LDT neuronjain. Kimutatták a szerotoninerget, 5-hidroxitriptamin 2-es (5HT<sub>2</sub>), hisztaminerg, GABAerg valamint a noradrenerg receptorokat is a kolinerg neuronokon (ld. **Reese és mtsai., 1995**). Bár az endokannabinoid rendszer elemeinek morfológiai jelenlétét legjobb tudomásunk szerint a magban célzottan nem vizsgálták, számos funkcionális adat utal rá, hogy endokannabinoidok is termelődhetnek és CB1 receptor-függő módon fejthetik ki hatásukat (ld. **Murillo-Rodriguez, 2008**).

### 3. A kannabinoid szignalizáció

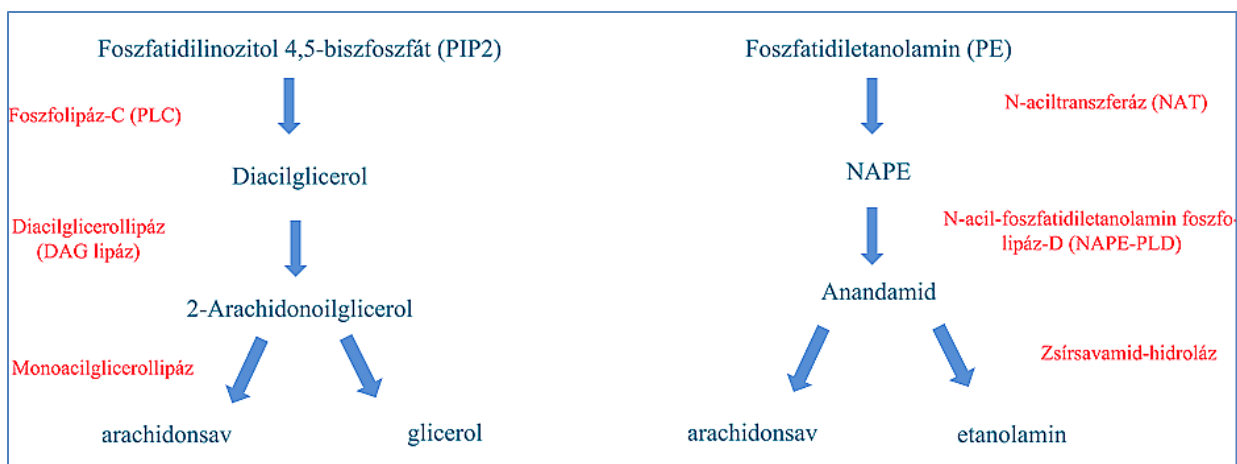
#### 3. 1. A kannabinoidok típusai, receptorai, hatásmechanizmusai

Bár a Cannabis sativa származékának (azon belül is a legjobban ismert  $\Delta^9$ -tetrahidrokannabinolnak) a pszichoaktív hatása ősidők óta ismert, viszonylag újonnan fedezték fel a receptorokat, amelyeken keresztül ez a hatóanyag kifejti a hatását. Az első ilyen receptor (ami a CB1 nevet kapta), a kilencvenes évek elejére került leírásra (**Devane és mtsai., 1988; Matsuda és mtsai., 1990**). Még később került felismerésre, hogy ezt a receptort endogén ligandok is képesek aktiválni, amely molekulák az endokannabinoidok néven váltak ismertté (szemben az exogén kannabinoidokkal, például a kannabisz származékaival; ld. **Di Marzo és mtsai., 1998**). Számos ilyen lipidtermészetű vegyületet azonosítottak; elsőként az anandamidot. Neve a szanszkrit "ananda" (belső öröm) szóból származik (**Devane és mtsai., 1992**). A prototípusos anandamid mellett számos más endokannabinoid is létezik, mint pl. a 2-arachidonoil-glicerol (2-AG), az oleamid, a virodhamin, a noladin éter vagy az N-arachidonildopamin (ld. **Murillo-Rodriguez, 2008; Freund és mtsai., 2003**).

Az endokannabinoidoknak a CB1 receptoron kívül további receptorai is ismertek. Elsősorban, de nem kizárólag perifériás lokalizációban (tipikusan az immunrendszerben) található meg a CB2 receptor (**Munro és mtsai., 1993**), valamint több, ún. nem-CB1, és nem-CB2 receptor. Ide tartoznak a G-fehérje kapcsolt receptorok, a GPR55 (ld. **Brown, 2007**;

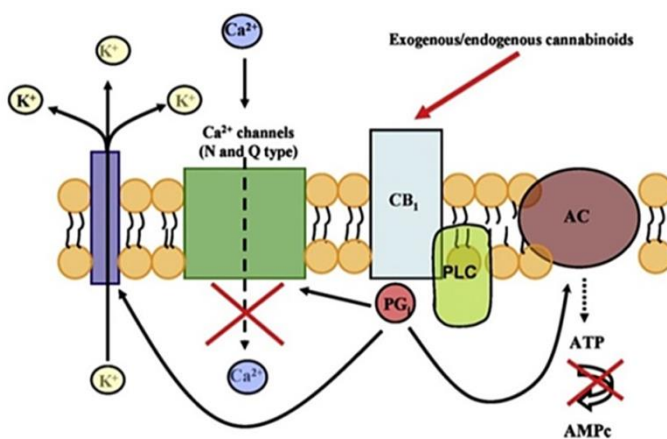
**Drmotá és mtsai., 2004)** és a GPR119 (**Overton és mtsai., 2006**). A fenti receptorokon kívül azonban az endokannabinoidok képesek direkt módon aktiválni más receptorokat és membránfehérjéket is (mint pl. az 1-es típusú tranziens receptor potenciál vanilloid csatorna (TRPV1), az 5-HT<sub>3</sub> receptor, a nikotin típusú acetilkolin (nACh) receptor, az NMDA receptor, az opioid receptorok, a T-típusú kalciumcsatorna, a két pórus doménnel rendelkező TASK-1 kálium csatorna (TASK=„TWIK-related acid sensitive potassium channel”) csatorna vagy feszültségfüggő nátriumcsatorna; ld. **Demuth és Molleman, 2006**).

Az endokannabinoidok szintézise és degradációja számos lépést magába foglal. A 2-AG szintézise során a feszültségfüggő kalciumcsatornán történő kalciumbelépés vagy I-es csoportú metabotróp glutamát-receptor (mGluR I) aktiváció a foszfolipáz C $\beta$  (PLC $\beta$ ) enzimet aktiválja, ami a foszfatidilinozitol hidrolízisével diacilglicerolt hoz létre. A diacilglicerolt a diacilglicerol lipáz  $\alpha$  (DGL $\alpha$ ) alakítja tovább 2-AG-vá (**Katona és mtsai., 2006; ld. Katona és Freund., 2012; Castillo és mtsai., 2012**). Az anandamid szintézisét ugyancsak a poszt-szinaptikus neuron depolarizációja és az intracelluláris kalciumszint emelkedése indítja el. Szintézisében az N-acil-foszfatidiletanolamin-hidrolizáló foszfolipáz-D (NAPE-PLD) enzim játszik fontos szerepet (**Okamoto és mtsai., 2007; ld. Di Marzo, 2011; ld. Castillo és mtsai., 2012**). A 2-AG degradációjában a monoacilglicerol-lipáz (MGL) játszik kiemelkedő szerepet. Ez az enzim képes a 2-AG hatásainak nagyságát és időtartamát is kontrollálni (**Blankman és mtsai., 2007; Hashimoto és mtsai., 2007; ld. Castillo és mtsai., 2012**). Az anandamidot degradáló fő enzim a zsírsavamid-hidroláz ("fatty acid amide hydrolase", FAAH; **Gulyás és mtsai., 2004**), melynek gátlása (például UCM707-el) fokozza az anandamid felszaporodását a szinaptikus résben. Az endokannabinoidok szintézisét és degradációját az 7. ábra foglalja össze.



7. ábra. Az endokannabinoidok szintézisének és degradációjának összefoglalása

A CB1 receptor a G-fehérje kapcsolt receptorok közé tartozik. A legtöbb forrás szerint  $G_{i/o}$  kapcsolt receptorként ismert, de  $G_s$  fehérjével is képes interakcióra (Bonhaus és mtsai., 1998; Maneuf és Brotchie, 1997; ld. Demuth és Molleman, 2006). A CB1 receptor stimuláció legrégebben megismert és legrészletesebben jellemzett hatása az adenilát cikláz gátlása, melyet részletesebben a 8. ábrán demonstrálunk (Howlett és Fleming, 1984; ld. Demuth és Molleman, 2006). Az endokannabinoid szignalizáció komplex voltát mutatja azonban, hogy az ellenkezőjét, a ciklikus adenzin monofoszfát (cAMP) szint emelkedését is leírták (Glass és Felder, 1997, Busch és mtsai., 2004; ld. Demuth és Molleman, 2006). Emellett a CB1 receptor stimuláció a mitogén-aktivált protein kináz-t (MAP kináz) is képes aktiválni (Bouaboula és mtsai., 1995; Galve-Roperh és mtsai., 2002). Ismert továbbá, hogy CB1 receptor stimuláció inozitol 1,4,5-trifoszfát (IP3) érzékeny raktárakból képes  $Ca^{2+}$ -ot mobilizálni és ezáltal emelni az intracelluláris kalciumkoncentrációt (Sugiura és mtsai., 1997). Az endokannabinoidok direkt módon és CB1 receptor függő úton is képesek ioncsatornákat modulálni. A P/Q-, N- és L-típusú kalciumcsatornákat gátolja a CB1 receptor aktiváció (Mackie és mtsai., 1995; Mackie és Hille, 1992; Demuth és Molleman, 2006). A receptor több káliumcsatorna nyitását képes stimulálni (G-fehérje kapcsolt befelé egyenirányító kálium csatorna (GIRK), A-áram; Mackie és mtsai., 1995; Deadwyler és mtsai., 1995), ugyanakkor a D-típusú (Mu és mtsai., 1999) és M-típusú káliumáramokat (Schweitzer, 2000) gátolja.



8. ábra. A CB1 receptor gátolja a P, Q és N típusú  $Ca^{2+}$  csatornákat és aktiválja a  $K^+$  csatornákat. Az exogén és endogén kannabinoidok gátolják az adenilát-cikláz és csökkentik a cAMP szintjét, valamint aktiválják a foszfolipáz C-t és a  $K^+$  csatornát. Rövidítések: AC = adenilát-cikláz; AMPc = cAMP; CB1 = 1-es típusú kannabinoid receptor; PGi = Gi kapcsolt fehérje; PLC = foszfolipáz C (Murillo-Rodríguez 2008).

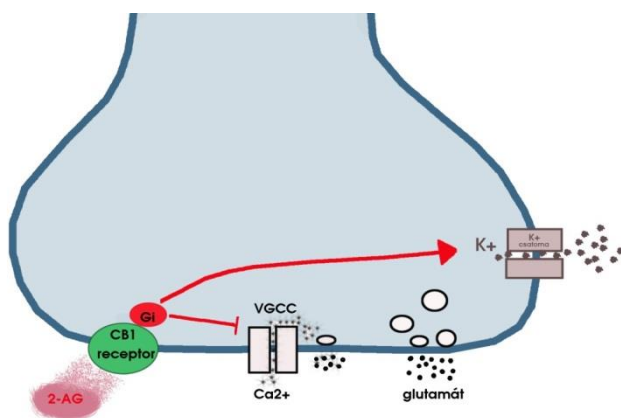
### 3.2. Az endokannabinoidok élettani szerepe a központi idegrendszerben

Az endokannabinoid rendszer hatásainak fent vázolt komplexitása alapján nem meglepő, hogy a központi idegrendszerben számos hatás tulajdonítható ezen rendszer aktiválódásának és

azon belül is a CB1 receptor stimulációnak. Az alábbiakban vázlatosan kívánok foglalkozni a CB1 receptor stimuláció preszinaptikus és asztrocitákon érvényesülő hatásaival.

### 3. 2. 1. Preszinaptikus hatások

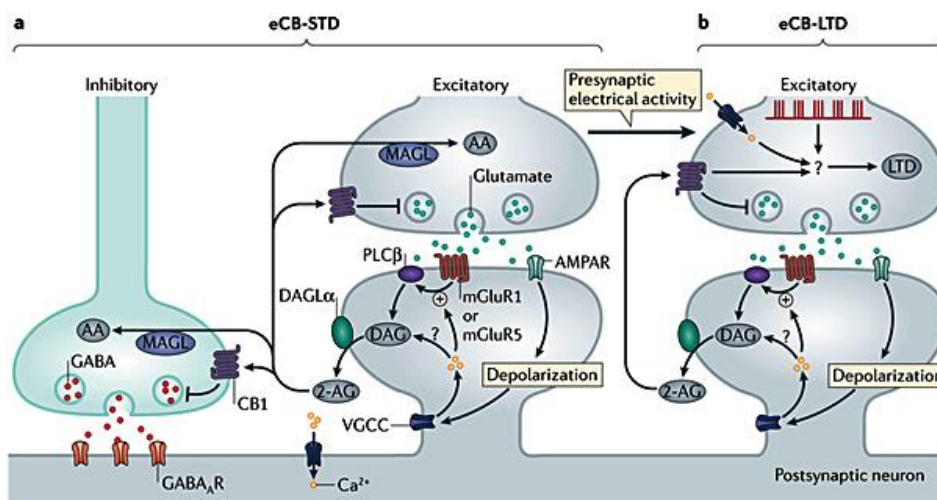
Az utóbbi másfél évtizedben számos tanulmány támasztotta alá, hogy a neuronális elemek CB1 receptorai zömmel preszinaptikus lokalizációban fordulnak elő (**Katona és mtsai., 1999; 2006**), és jól ismertek a szinaptikus neurotranszmissziót befolyásoló rövid, valamint hosszú távú hatásaik is. Az endokannabinoidok által megvalósuló retrográd szignalizáció a rövid távú szinaptikus szabályozást a gátló és serkentő szinapszisok depolarizáció által indukált szuppresszióján keresztül valósítja meg. A retrográd neurotranszmisszió által triggerelt rövid távú szinaptikus plaszticitásnak a példája a gátló szinapszisok depolarizáció által indukált szuppressziója ("depolarization-induced suppression of inhibition", DSI), valamint a serkentő szinapszisokon érvényesülő ugyanezen hatás ("depolarization-induced suppression of excitation", DSE)(**Ohno-Shosaku és mtsai., 2001; Wilson és Nicoll, 2001; Kreitzer és Regehr, 2001**). A posztzinaptikus neuron depolarizációja (vagy posztzinaptikus mGluR aktiváció, G-fehérje-mediált folyamatokon keresztül) endokannabinoid felszabaduláshoz vezet. Az endokannabinoidok a preszinaptikus CB1 receptorhoz kötődnek, és ott G-fehérje függő módon feszültségfüggő kalciumcsatornákat gátolnak; ezáltal mérsékelve a neurotranszmitter felszabadulást (**Brown és mtsai., 2003; Kreitzer és Regehr, 2001; Wilson és Nicoll, 2001; Id. Castillo és mtsai., 2012**). Ennek folyamatát a 9. ábra mutatja be.



9. ábra. A preszinaptikus endokannabinoid által mediált szinaptikus depresszió folyamatát ábrázoló sematikus rajz. A 2-AG, aktiválva a preszinaptikus sejt CB1 receptorát, mely G<sub>i</sub> fehérjén keresztül gátolja a feszültségfüggő Ca<sup>2+</sup>csatornákat és aktiválja a K<sup>+</sup> csatornákat. A K<sup>+</sup> csatornák aktivációja hiperpolarizálja a preszinaptikus membránt, gátolja a Ca<sup>2+</sup> belépést és a glutamát felszabadulást. Az extracelluláris kannabinoidok az MG lipáz által katalizált 2-AG termelésen valósul meg, amely kulcsfontosságú a DSE/I kialakulásában (**Lovinger, 2008** alapján).

A rövid távú plaszticitás mellett a hosszú távú plaszticitásban is szerepet kapnak az endokannabinoidok és a CB1 receptor; az endokannabinoid mediált hosszú távú depressziót kialakítva (eCB-LTD; **Gerdeman és mtsai., 2002; Robbe és mtsai., 2002**). Itt elsősorban az

adenilát cikláz gátlásán és a cAMP csökkenésén keresztül jön létre a hatás. A eCB-LTD inputspecifikussága is ismert, a preszinaptikus CB1 receptor aktiváció mellett a szinapszis aktív volta is szükséges a hatás létrejöttéhez (Heifets és mtsai., 2008; Singla és mtsai., 2007; ld. Castillo és mtsai., 2012). A teljesség kedvéért érdemes megjegyezni, hogy a CB1 receptor nem feltétlenül szükséges ahhoz, hogy az anandamid LTD-t hozzon létre. Ismert ugyanis az LTD egy TRPV1 receptoron keresztül megvalósuló, posztszinaptikus formája is. Itt az mGluR I (azon belül is az mGluR5) és intracelluláris kalciumkoncentráció-emelkedés vezet az anandamid szintéziséhez és a TRPV1 aktivációjához (10. ábra; Van der Stelt és mtsai., 2005).



**10. ábra. Az endokannabinoidok által kiváltott rövid ill. hosszú távú szinaptikus plaszticitás mechanizmusa.** **a**, Az endokannabinoidok által kiváltott rövid távú szinaptikus depresszió (eCB-STD) során a depolarizáció hatására aktiválódó AMPA receptor aktivációjakor, a  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlás a feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$  csatornákon (VGCC) keresztül megy végbe, melynek során aktiválódik a DAGL $\alpha$ . Az mGluR1-es vagy mGluR5-ös receptor aktivációjakor  $\text{G}_{q/11}$  fehérjén keresztül aktiválódik a foszfolipáz-C $\beta$ . A 2-AG, miután felszabadult a posztszinaptikus sejtől, bekötődhet egy gátló vagy egy serkentő axon terminálison elhelyezkedő CB1 receptorhoz. A CB1 receptorhoz kötődve gátolja a neurotranszmitter felszabadulást, majd ezt követően lebomlik arachidonsavra, monoacil-glicerol lipáz hatására. A serkentő szinapszisban felszabaduló glutamát  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlást vált ki az AMPA típusú glutamát receptoron (AMPA) keresztüli depolarizáción és a feszültségfüggő kalciumcsatornák (VGCC) megnyílásán keresztül. Az mGluR1-es és 5-ös receptor aktivációjával további 2-AG felszabadulást vált ki a posztszinaptikus sejtől. Az így felszabadult 2-AG pedig bekötődhet egyrészt ugyanazon terminális (homoszínaptikus), avagy más környező gátló vagy serkentő terminálisok (heteroszínaptikus) CB1 receptorához. **b**, A hosszú távú szinaptikus depresszió (eCB-LTD) az afferens stimuláció révén kiváltott 2-AG felszabadulás mechanizmusa ugyanezen mechanizmusok révén játszódik le, mint az a. panelen. A felszabadult 2-AG aktiválja az axon terminálison elhelyezkedő CB1 receptort. A CB1 receptor aktivációja mellett a preszinaptikus elektromos aktiváció, a feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$  csatornákon történő  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlás, illetve az NMDA receptorokon keresztül lezajló  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlás összehangolt működése együttesen járul hozzá az endokannabinoidok által kiváltott hosszú távú szinaptikus depresszió (eCB LTD) létrejöttéhez (Soltész és mtsai., 2015).

### 3. 2. 2. Az alvás és a kannabinoidok

Régóta ismert, hogy a kannabinoidok hatással vannak az alvás-ébrenlét ciklusokra. Már korai tanulmányok kimutatták, hogy mind a REM - (gyors szemmozgással járó = „rapid eye movement”) alvás időtartama, mind a szemmozgások mértéke csökkent marijuána fogyasztását követően **(Feinberg és mtsai., 1975)**. A REM alvás időtartamának csökkenésével párhuzamosan a lassú hullámú alvás időtartama megemelkedik **(Pivik és mtsai., 1972)**. Ezen kívül, alvás megvonás során megemelkedik a liquorban az anandamid és oleamid koncentrációja **(Murillo-Rodriguez, 2008; Murillo-Rodriguez és mtsai., 2008; Mendelson és Basile, 1999)**. Ismert továbbá, hogy az endokannabinoidok termelődése és hatásai is cirkadián változásokat mutatnak, és részt vesznek az alvás-ébrenlét ciklusainak szabályozásában. Az inaktív periódus alatt a CB1 receptor denzitása 5%-kal megnövekszik a hídban és a hippocampusban is, míg az aktív periódusra tehető az anandamid szintjének a megemelkedése **(Martinez-Vargas és mtsai., 2003; Rueda-Orozco és mtsai., 2008; ld. Vaughn és mtsai., 2010)**. Mivel az anandamid koncentrációja és a CB1 receptor denzitása nincs fázisban egymással, így valószínűsíthető, hogy az endokannabinoid hatékonysága is változik a cirkadián ritmusnak megfelelően **(ld. Vaughn és mtsai., 2010)**.

In vivo állatkísérletekben, közvetlenül a PPN-be vagy agykamrákba injektált anandamid képes volt mind a lassú hullámú, mind a REM-alvás időtartamát megnyújtani. A hatást CB1 receptor antagonisták alkalmazásával ki lehetett védeni, így valószínűsíthető, hogy a kannabinoidok ezen hatása CB1 receptoron keresztül megy végbe **(Murillo-Rodriguez, 2008; Murillo-Rodriguez és mtsai., 2008; Herrera-Solís és mtsai., 2010)**.

### 3. 2. 3. Az asztrociták CB1 receptorai

A neuronális elemeken preszinaptikus lokalizációban előforduló CB1 receptorokon túl ismert, hogy az asztrociták is rendelkeznek ezzel a receptortípussal **(Molina-Holgado és mtsai., 2003; ld. Stella, 2004; Walter és Stella, 2003; Rodriguez és mtsai., 2001; Moldrich és Wenger, 2000; Salio és mtsai., 2002; Hegyi és mtsai., 2009)**. Az asztrociták CB1 receptorának aktiválása effektíven képes neuronális funkciókat is befolyásolni. Leírásra került, hogy a hippocampalis piramissejtek depolarizációja során felszabaduló endokannabinoidok aktiválják az asztrociták CB1 receptorait, amelyek kalciumhullámokat produkálnak és glutamátot szabadítanak fel. Ez a glutamát képes egyrészt extraszinaptikus NMDA receptorok aktiválásán keresztül lassú befelé irányuló áramokat (slow inward current,

SIC) létrehozni a szomszédos piramis sejteken, másrészt preszinaptikus metabotróp glutamát receptorokon (mGluR) potenciózni a serkentő neurotranszmissziót (**Navarrete és Araque, 2008; 2010**). A rövid távú hatásokon túl az asztrociták CB1 receptorának aktivációja is képes LTD-t indukálni a neocortexben. Az asztrociták itt is glutamátot szabadítanak fel a CB1 receptor stimuláció hatására, ami preszinaptikus NMDA receptorokat aktiválva hozza létre az LTD-t (**Min és Nevian, 2012**).

Egyre több bizonyíték van arra vonatkozóan is, hogy az asztrociták nemcsak reagálnak a felszabaduló endokannabinoidokra, hanem maguk is képesek felszabadítani endokannabinoidokat. Az asztrociták rendelkeznek az ehhez szükséges enzimekkel (**Hegyi és mtsai., 2012**), és a sejt kultúrában fenntartott asztrociták 2-AG- és anandamid-felszabadításáról is létezik adat (**Id. Stella, 2009**).

#### 4. Az asztrociták főbb sajátosságai és funkciói

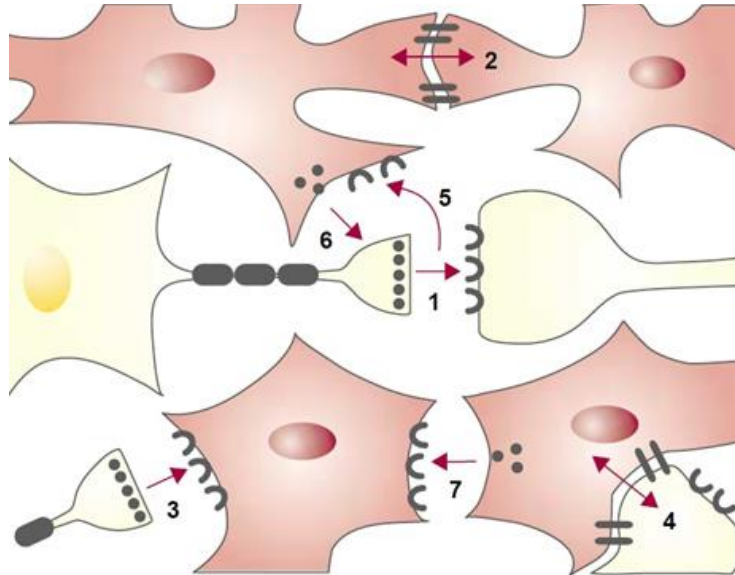
A gliasejtek alapvetően két nagy csoportra oszthatóak. Az egyik nagy csoportot a **makroglia sejtek** alkotják, amelybe a *Schwann-sejtek*, *oligodendrociták* és az *asztrociták* tartoznak, a másik nagy csoport pedig a **mikroglia** (**Id. Ndubaku és Bellard 2008; Fields és Stevens-Graham 2002**). Az asztrocitáknak, előfordulásuk szerint több, különböző névvel jelölt változata van, így például a retinában elhelyezkedő asztrocitákat *Müller-sejtek*, a cerebellum asztrocitáit pedig *Bergmann-gliának* nevezzük. Ezen kívül a szürkeállomány és a fehérállomány asztrocitáit is megkülönböztetjük egymástól: a szürkeállomány asztrocitáit *protoplazmás*, míg a fehérállomány asztrocitáit *fibrózus* asztrocitáknak nevezzük. A protoplazmás asztrociták főként a neuronok sejttestjével vannak kapcsolatban, míg a fibrózus asztrociták a neuronok axonjával képeznek közvetlen kapcsolatot (**Allen és Barres, 2009**). A gliasejtek, funkcióik alapján talán a legsokoldalúbb sejtek az emlős szervezetben, mivel szerepük van a sejtek vándorlásában, a neuronok védelmében és proliferációjában, valamint a trofikus hatásokban, mint az idegsejtek táplálása (**Ndubaku és Bellard 2008**). A klasszikusan asztrocitáknak tulajdonított homeosztatisz funkciók mellett azonban egyre több adat ismert a szinaptikus neurotranszmisszióban (pl. "tripartite synapse" koncepciója) és a neuronális excitabilitás általános szabályozásában betöltött szerepükről.

#### 4. 1. Az asztrociták fiziológias folyamatokban betöltött szerepe

Az asztrociták fontos szerepet játszanak a fejlődés szabályozásában, a véráramlás szabályozásában (prostaglandin, nitrogén-monoxid, valamint arachidonsav felszabaduláson keresztül vannak hatással az érátmérőre), valamint a folyadék-, ion-, pH-, és neurotranszmitter homeosztázis folyamataiban is részt vesznek. Az asztrociták egyik fontos funkciója az extracelluláris térből történő  $K^+$  felvétel. Az asztrociták kemoszenzitív szerepe is ismert (**Gourine és mtsai., 2010**). Ezen kívül a szinaptikus neurotranszmissziót is szabályozzák; számos transzportert expresszálnak a glutamát, GABA és glicin számára. Mindezek mellett, nagyon fontos szerepük van a központi idegrendszer metabolikus folyamataiban, mivel felveszik a vérben megtalálható glükózt, továbbá a központi idegrendszer fontos glikogén raktárai, a hipoglikémiás állapotokban ők segítenek fenntartani a neuronok aktivitását (**Id. Verkhratsky és mtsai., 2012; Sofroniew és Vinters 2010**). Mivel az asztrociták fontos gliotranszmittere az adenzin, ami az alvásban közismert szerepet játszik, így joggal feltételezhető hogy az asztrociták szerepet játszanak az alvás szabályozásában. Habár az asztrociták elektromosan nem excitábilisak, mégis a metabotróp receptorok aktiválásakor  $Ca^{2+}$  szabadul fel az asztrocitákból, mely pedig számos transzmitter felszabadulásához vezet (**Halassa és mtsai., 2009**).

Az asztrociták a szinaptikus neurotranszmisszió szabályozásában a neuronok aktív partnerei. Szemben a szinapszisok klasszikus leírásával, ahol a résztvevő két partner a pre- és a posztzinaptikus neuron ("bipartite synapse"), a szinapszisokhoz közeli asztrociták - harmadik partnerként- specifikusan reagálnak neurotranszmitterekre és gliotranszmitterek révén maguk is befolyásolják a szinaptikus neurotranszmissziót ("tripartite synapse"). A neuron-asztrocita kommunikáció fontos voltát jelzi, hogy az asztrocitákon találhatóak neurotranszmitter receptorok. Az asztrociták nagyszámú (elsősorban metabotróp) receptort expresszálnak számos neurotranszmitter számára (pl.: glutamát, adenzin, norepinephrin, GABA, hisztamin, acetilkolin stb.). Az asztrociták receptorainak aktivációja kalciumhullámok létrejöttéhez vezet, és ennek következtében számos gliotranszmitter szabadulhat fel, mint például a glutamát, GABA, acetyl-kolin, noradrenalin, nitrogén-monoxid (**Perea és Araque 2005**). Ahelyett, hogy az asztrociták egyformán és lineárisan reagálnának a neurotranszmitterek felszabadulására, számos jel utal arra, hogy képesek integrálni és befolyásolni a szinaptikus funkciókat. Különböző neurotranszmitterekre (**Perea és Araque, 2005**) és eltérő szinaptikus bemenetek stimulációjára (**Parri és mtsai., 2004; Schipke és**

**mtsai., 2008)** eltérően képesek reagálni. Az asztrociták reakciója nem lineáris az őket aktiváló bemenetek aktivitásával vagy a neurotranszmitterek exogén alkalmazásával (**Perea és Araque, 2005**). A neuronok és gliasejtek közötti kommunikációt a 11. ábrán szemléltetjük.



**11. ábra. A neuron-glia jelátvitel összefoglaló ábrája.** A neuronokat sárga, az asztrocitákat pedig rózsaszín jelöli. A kommunikáció legáltalánosabb formája, mikor 2 neuron között jön létre szinapszis (1), valamint a gliasejtek között kialakult elektromos szinapszis/gap junction (2). Viszont létrejöhet kémiai szinapszis egy preszinaptikus neuron, és egy posztzinaptikus gliasejt között is (3), valamint gap junction-ok alakulhatnak ki a gliasejtek és a neuronok között (4). A szinaptikus transzmisszió a neuronok között is aktiválhatja a preszinaptikus gliasejteket, mivel a neurotranszmitterek kikerülve a szinaptikus részbe, megfelelő koncentrációban hozzákötődhetnek a gliasejtek plazmamembránján elhelyezkedő receptoraikhoz (5). A gliasejtek aktivációját követően, gliotranszmitterek szabadulnak fel és aktiválják a szomszédos neuronokat (6). A gliasejtek hatással lehetnek a környező gliasejtekre is, mivel fokozhatják a környező gliasejtekből történő transzmitter felszabadulást (7) (**Id. Bezzi és Volterra 2001**).

Az asztrociták aktivációja mind a rövid-, mind a hosszú távú szinaptikus plaszticitás mechanizmusaihoz hozzájárul. A hippocampalis inhibitorikus posztzinaptikus áramok (inhibitory postsynaptic current-IPSC) és serkentő posztzinaptikus áramok (excitatory postsynaptic current-EPSC) frekvenciáját képesek fokozni (**Araque és mtsai., 1998; Jourdain és mtsai., 2007; Liu és mtsai., 2004**), vagy a szinaptikus neurotranszmissziót gátolni (**Liu és mtsai., 2004; Araque és mtsai., 1998**). A hosszú távú potencírozás ("long term potentiation", LTP) mechanizmusának modulációjában is szerepet kapnak: képesek azt glutamátfelszabadítás és preszinaptikus mGluR aktiváció által indukálni (**Perea és Araque, 2007**), vagy a szinapszisok és asztrociták kapcsolatának változtatásával képesek az NMDA receptor aktiváció szabályozására (**Panatier és mtsai., 2006**). A szinaptikus funkciók

szabályozásán túl az asztrociták lényeges szerepet töltenek be a neuronok excitabilitásának beállításában az extracelluláris neurotranszmitterek koncentrációjának szabályozása révén.

#### 4. 2. Az asztrociták $\text{Ca}^{2+}$ szignalizációja és „excitabilitása”

Az asztrociták elektromosan nem excitábilisak, melynek egyik oka az, hogy nem rendelkeznek feszültségfüggő ioncsatornákkal olyan denzitásban, mint ami a neuronok membránjában megfigyelhető. Bár az asztrociták membránjában is találhatóak kálium- és nátriumcsatornák, ezeken a sejteken nem alakul ki akciós potenciál. Másrészt viszont, az asztrociták képesek mind spontánul, mind stimuláció hatására az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációjukat megváltoztatni, amit az irodalom "kalcium excitabilitás"-ként említ (**Perea és Araque, 2005**). Az asztrocitákra jellemző  $\text{Ca}^{2+}$  oszcillációkat már számos agyterületen kimutatták, mint például a ventrobazalis thalamus, hippocampus, cerebellum és a neocortex (**Id. Parri és mtsai., 2002; Araque és mtsai., 2002**). A  $\text{Ca}^{2+}$  jelátvitel mechanizmusa különbözik az excitábilis sejtekben (például neuronokban) ill. a központi idegrendszer nem-excitábilis sejteiben (gliasejtek). Az excitábilis sejtekben a citoplazmatikus  $\text{Ca}^{2+}$  jel kialakulásakor, a  $\text{Ca}^{2+}$  belépés egyaránt származhat a feszültség- vagy ligandfüggő  $\text{Ca}^{2+}$  csatornákból, valamint az intracelluláris raktárakból. A nem-excitábilis sejtekben a  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulás a belső raktárakból valósul meg. Mindkét esetben az eredmény a megemelkedett intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció (**Id. Verkhratsky és Kettenmann 1996**).

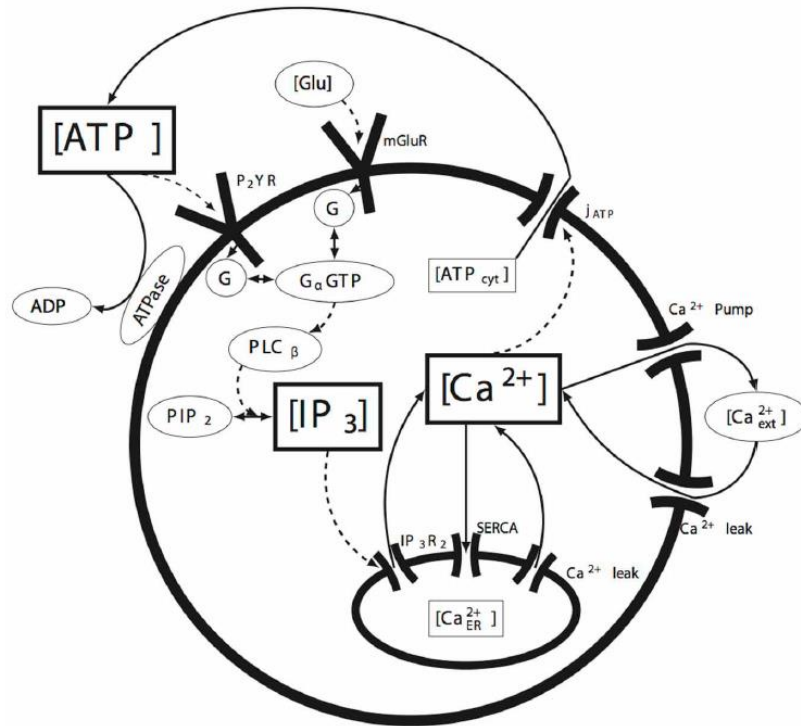
Az asztrociták változatos kalciumjeleit több csoportba lehet osztani aszerint, hogy a sejt nyúlványait, szómáját vagy az egész sejtet érintik; továbbá hogy továbbterjednek-e a környező asztrocitákra. A kalciumjelek alapja az asztrociták számos metabotróp receptorának aktivációja, ami inozitol 1,4,5-trifoszfát (IP3) képződéséhez és az intracelluláris kalciumraktárakból történő IP3-indukált kalciumfelszabaduláshoz vezet (**Hamilton és mtsai., 2008; Kirischuk és mtsai., 1996; Id. Verkhratsky és mtsai., 2012**). A kalciumjelek blokkolhatóak a szarko/endoplazmatikus retikulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPáz (SERCA) pumpa gátlásával (pl. thapsigarginnal) vagy az IP3 receptor gátlásával (pl. intracellulárisan alkalmazott heparinnal; **Kirischuk és mtsai., 1995; Id. Verkhratsky és mtsai., 2012**). Az asztrociták között terjedő kalciumhullámok hátterében az IP3 és a kalcium diffúziója áll, mely gap junction-okon megy végbe; emiatt a gap junction gátlása megakadályozza a kalciumjel továbbterjedését (**Kuga és mtsai., 2011**). Mindezek mellett az aktivált asztrocitákból történő ATP felszabadulás aktiválja a környező asztrociták purinerg receptorát, és ezzel további extracelluláris szignált hoz létre (**Guthrie és mtsai., 1999**).

Az asztrociták fő IP3 receptora a 2-es típusú IP3 receptor (**Petravicz és mtsai., 2008; Sheppard és mtsai., 1997; Id. Verkhatsky és mtsai., 2012**), ami legnagyobb sűrűségben az asztrociták disztális nyúlványaiban fordul elő, ahol a metabotróp receptorok aktivációját követő kalciumhullámok keletkeznek (**Holtzclaw és mtsai., 2002; Id. Verkhatsky és mtsai., 2012**). A ryanodin receptorok kalciumhullámokban játszott szerepét egyes tanulmányok felvetik a thalamusban (**Parri és Crunelli, 2003; Matyash és mtsai., 2002**), de mindez nincs alátámasztva a hippocampalis asztrocitákon (**Beck és mtsai., 2004; Id. Verkhatsky és mtsai., 2012**).

A metabotróp receptorok aktivációján túl a kalciumhullámok generálásában ionotróp receptorok (mint AMPA- és NMDA-típusú glutamát-receptorok vagy P2X purinoceptorok) is részt vehetnek. Az AMPA-receptorok közül a GluR2-t nem expresszáló és így kalciumpermeabilis receptorok kapnak ebben szerepet (**Burnashev és mtsai., 1992**). Az asztrocitákon levő NMDA-receptoroknak is vannak speciális jellemzői, mint pl. a gyenge  $Mg^{2+}$ -blokádnak, az alacsonyabb kalcium permeabilitás és a jellegzetes alegység-összetétel (NR1, NR2C/D és NR3 alegységek; **Palygin és mtsai., 2010; 2011**). Az asztrociták a  $Na^+/Ca^{2+}$  antiporterek számos típusát expresszálják (NCX1, NCX2, NCX3), amelyek mindkét irányba képesek működni, így szerepet kapnak mind a kalcium-eltávolításban, valamint a kalciumjelek kialakításában (**Minelli és mtsai., 2007; Goldman és mtsai., 1994; Takuma és mtsai., 1994; Kirischuk és mtsai., 1997**). A cseremechanizmus reverz működéséhez elengedhetetlen az intracelluláris nátriumkoncentráció megemelkedése, ami vagy az ionotróp receptorok aktivációjának, vagy a glutamáttranszporterek működésének lehet a következménye. Mindezekon túl a membrán kisebb mértékű depolarizációja is indukálhatja a reverz módú működést (**Kirischuk és mtsai., 2007; Paluzzi és mtsai., 2007; Rojas és mtsai., 2007**).

Az asztrocitákon kimutatták a feszültségfüggő kalciumcsatornák expresszióját is (L, N, P/Q, R, T-típusúakat; **Parpura és mtsai., 2011; Araque és mtsai., 2002; Pasti és mtsai., 1997; Id. Agulhon és mtsai., 2008**). Ezen csatornák funkcionális jelentősége azonban nem egységesen bizonyított: egyesek leírták a feszültségfüggő kalciumáramok jelenlétét (**Akopian és mtsai., 1996**), míg mások nem támasztották alá (**Id. Carmignoto és mtsai., 1998**). Eddig mindössze a ventrobazalis thalamusban mutatták ki ezen csatornák szerepét az asztrociták kalciumhullámjainak generálásában. Itt a spontán kalciumhullámokért az intracelluláris kalciumraktárakból történő kalciumfelszabaduláson túl a feszültségfüggő, nifedipinnel gátolható kalciumcsatornák voltak a felelősek (**Parri és Crunelli, 2003; Parri és mtsai.,**

2001). Az asztrociták kalciumhullámaint lehetséges triggerelni optogenetikai módszerekkel is. Az asztrociták által szelektíven kifejezett channelrhodopsin-2 kék fényel történő aktivációja kalciumbelépéshez és ATP felszabaduláshoz vezet (Figueiredo és mtsai., 2011; Gourine és mtsai., 2010; Chen és mtsai., 2012). Az asztrociták  $Ca^{2+}$  szignalizációját a 12. ábrán mutatjuk be.



12. ábra. Jelátviteli útvonala az asztrocitákban. Amikor a 2-es típusú purinerg receptor (P2Y) vagy mGluR G-fehérje kapcsolt (GPCRs) receptor, ATP-n vagy glutamáton keresztül aktiválódik, a G-fehérje aktiválódik és szabaddá válik a  $G_{\alpha}$  alegység. Ezt követően aktiválódik a foszfolipáz-C, amely fokozza a foszfatidilinoszitol 4,5-biszfoszfátból történő diacil-glicerol és IP<sub>3</sub> képződést. Az IP<sub>3</sub> ezt követően bekötődve az endoplazmatikus retikulum IP<sub>3</sub> receptorához fokozza a  $Ca^{2+}$  felszabadulást, amely pedig kiváltja a  $Ca^{2+}$  aktivált  $Ca^{2+}$  felszabadulást. Az asztrociták elsődlegesen IP<sub>3</sub>R<sub>2</sub>-es altípust, míg a neuronok elsősorban az IP<sub>3</sub>R<sub>1</sub>-es és 3-as altípusát expresszálják. Az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció növekedése ATP felszabadulást hoz létre. A  $Ca^{2+}$  visszavételezését az endoplazmatikus retikulumba a SERCA pumpa végzi, az ATP lebontását pedig az ATPázok végzik (MacDonald és Silva 2013).

### 4. 3. Gliotranszmisszió

A gliotranszmitterek képesek fázisos és tónusos serkentő és gátló áramokat létrehozni a közelükben levő neuronokon. A gliotranszmittereket 3 fő csoportba soroljuk. Az első csoportba az aminosavak (pl.: glutamát, D-szerin), a másodikba a nukleotidok (pl.: ATP), a harmadik csoportba pedig a peptidok tartoznak (pl.: atriális natriuretikus peptid, BDNF). A

gliasejtekből történő transzmitter felszabadulás 3 fő mechanizmuson mehet végbe. Végbemeget *csatornákon keresztül* (anion csatornán, connexonokon, purinerg receptoron keresztül), *transzportereken keresztül* (excitatórikus aminosav transzportereken, cisztein-glutamát antiporterén keresztül), valamint *Ca<sup>2+</sup> függő exocitózis* útján (pl. glutamát). A gliotranszmitterek, mint a glutamát, D-szerin, tumor nekrozis faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) és az ATP felszabadulása intracelluláris Ca<sup>2+</sup> felszabaduláshoz kötött.

Az asztrocitákból történő glutamát felszabadulás 6 fő mechanizmuson keresztül valósulhat meg. Az egyik fő mechanizmus a glutamát transzporterek reverz módú működése révén valósul meg. Ezen kívül végbemeget anioncsatorna-indukált mechanizmuson keresztül, Ca<sup>2+</sup> függő exocitózis révén, cisztein-glutamát cseremechanizmuson keresztül, ionotróp purinerg receptorokon keresztül, vagy pedig connexonokon keresztül. A *Ca<sup>2+</sup> függő exocitózis* során, az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> megemelkedés szükséges a glutamát felszabaduláshoz. **(Parpura és mtsai., 1994).**

A *glutamát transzporterek* reverz módú működése a glutamát felszabadulás másik fő mechanizmusa. Az asztrociták több glutamát transzporterrel rendelkeznek, mint pl. a L-glutamát/aszpartát transzporter és az 1-es típusú serkentő aminosav transzporterek (GLAST-1; EAAT-1) és a gliális L-glutamát transzporter valamint a 2-es típusú serkentő aminosav transzporterek (GLT-1; EAAT-2) **(Parpura és mtsai., 1994).**

A *cisztein/glutamát antiporter* a plazmamembrán Na<sup>+</sup> függő antiportere; cisztein/glutamát cserélő blokkolókat alkalmazva 60%-kal csökkent az extracelluláris glutamát-koncentráció a striatum területén. Kimutatták továbbá, hogy a cisztein alkalmazásakor emelkedett az extracelluláris glutamát-koncentráció és csökkent a szinaptikus aktivitás. Ennek bizonyításakor, ezek a hatások blokkolhatóak voltak mGluR II receptor antagonistával (LY341495; **Warr és mtsai., 1999).**

A *P2X7 receptor* ATP által nyitott kation szelektív ioncsatorna, amely szintén mediálhatja a glutamát-felszabadulást az asztrocitákból **(Duan és mtsai., 2003.).**

Az *anioncsatornákon* keresztül felszabaduló glutamát 2 féle csatornán keresztül szabadulhat fel. Az egyik az ún. térfogatérzékeny kifelé egyenirányító anioncsatorna (volume-sensitive outwardly rectifying-VSOR) kloridcsatorna, és a „maxi”-anion csatorna. Kimutatták hogy ezen csatornák átjárhatóak inorganikus illetve kisebb organikus anionok,

aminosavak számára (mint taurin, aszpartát és glutamát). Hipoozmotikus körülmények között (ami ischaemia esetében is megfigyelhető) a sejtek (így az asztrociták is) megduzzadnak. Ezt a duzzadást a VSOR csatornák nyitása kompenzálja. Mivel ez a csatorna glutamátra is permeábilis, ez a folyamat glutamátfelszabadulást okoz az asztrocitákból (**Id. Malarkey és Parpura 2007**).

A *connexonoknak* vagy gap junction-oknek számos típusát leírták már. Az asztrocitákban főként a Cx43 csatornát mutatták ki, melyen keresztül glutamát szabadulhat fel (**Ye és mtsai., 2003; Id. Malarkey és Parpura 2007**).

Számos kortikális és szubkortikális struktúrán kimutatták a neuronális lassú befelé irányuló áramok ("slow inward current"; SIC) jelenlétét. Ezek az asztrocitákból történő glutamátfelszabadulás és neuronális extraszinaptikus, NR2B alegységet tartalmazó NMDA receptorok aktiválódásának a következményei. Amplitúdójukban és kinetikai paramétereikben jelentősen különböznek a szinaptikus aktivitásból származó EPSC-ktől, mivel azoknál nagyobbak és jelentősen lassabbak (**Angulo és mtsai., 2004; Id. Perea és Araque, 2005; Carmignoto és Fellin, 2006; Perea és mtsai., 2014; Id. Fellin, 2009**). Bár kevesebb struktúrában (csak a hippocampusban, thalamusban és bulbus olfactoriusban), de leírták a neuronális lassú kifelé irányuló áramok ("slow outward current", SOC) létezését is. Ezek az áramok az asztrocitákból történő GABA vagy ATP felszabadulásának a következményei, és neuronális A1 adenzin- vagy extraszinaptikus GABA<sub>A</sub> receptor aktiváció következményei (**Le Meur és mtsai., 2012; Pirttimaki és mtsai., 2013; Kozlov és mtsai., 2006; Lőrincz és mtsai., 2009**).

Az asztrociták működése során kialakuló neuronális tónusos serkentő vagy gátló áramok ugyancsak GABA, glutamát vagy ATP felszabadulás következtében jönnek létre. Ezen áramok kialakulása nagymértékben függ az extracelluláris tér neurotranszmitter- vagy gliotranszmitter-koncentrációjától, mely arra utal, hogy nem csupán az asztrociták járulhatnak hozzá kialakulásukhoz, hanem a szinapszisokból szétszóródó és a "volume transmission" során felszabaduló neurotranszmitterek is (**Id. Capogna és Pearce, 2011**). Több esetben az asztrocita-aktivációt követő neuronális áramok fázisos vagy tónusos természete a gliotranszmitter diffúziójának lehetőségeitől, a neuron és az asztrocita egymáshoz viszonyított helyzetétől függenek (**Angulo és mtsai., 2004; Jabaudon és mtsai., 1999**).

## Célkitűzések

Kísérleteink során a PPN neuronjain érvényesülő neuromodulációs hatásokat, azok mechanizmusait, célpontjait és átfedéseit vizsgáltuk, az alábbi pontok szerint.

1. A PPN neuronjainak CB1 receptor agonisták hatására bekövetkező membránpotenciál- és akciós potenciál tüzelési frekvencia változásának vizsgálata patch-clamp technikával, vad típusú és CB1 receptor knockout állatokon.
2. A CB1 receptor stimuláció neuronális hatásainak farmakológiai jellemzése, az abban szerepet játszó egyéb receptorok feltérképezése.
3. A neuronális szubpopulációk és a CB1 receptor stimuláció hatása közötti korrelációk vizsgálata.
4. Az asztrociták kannabinoid stimuláció által történő aktivációjának és az ezzel párhuzamos neuronális hatások összefüggéseinek vizsgálata.
5. A CB1 receptor lokalizációjának meghatározása immunhisztokémiai módszerrel.
6. A kolinerg és kannabinoid stimuláció PPN neuronokra gyakorolt hatásainak összehasonlítása.

## Anyagok és módszerek

### 1. Oldatok

A funkcionális mérésekhez, az általunk készített mesterséges agy-gerincvelői folyadékot (aCSF) használtunk, amely a következő komponenseket tartalmazta: 120 mmol/l NaCl; 2,5 mmol/l KCl; 26 mmol/l NaHCO<sub>3</sub>; 10 mmol/l glükóz; 1,24 mmol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2 mmol/l CaCl<sub>2</sub>; 1 mmol/l MgCl<sub>2</sub>; 3 mmol/l mio-inozitol; 0,5 mmol/l aszkorbinsav és 2 mmol/l Na<sup>+</sup> piruvát; pH 7,3. A preparálás során egy módosított, alacsony nátriumtartalmú aCSF-et (low Na aCSF) használtunk, ahol a 95 mmol/l NaCl-ot lecseréltük 130 mmol/l szacharózra és 60 mmol/l glicerolra. Az összes vegyszer a Sigma Kft.-től (St. Louis, Missouri, USA) lett megvásárolva; kivéve, ahol az alábbiakban a forrás említésre kerül.

Egyes funkcionális mérések során a normál aCSF extracelluláris oldatot kiegészítettük glutamaterg, glicinerg, és GABAerg neurotranszmissziót blokkoló oldatra. A glutamaterg ingerületáttevődést 10 μmol/l 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl benzo[f]quinoxaline-2,3dione-al (NBQX), 50 μmol/l D-2-amino-5-foszopentanoáttal (D-AP5); a glicinerg neurotranszmissziót 1 μmol/l sztrichninnel, a GABAerg szinapsziszokat pedig 10 μmol/l bikukullinnal blokkoltuk.

A kalciumkoncentráció-mérések az Oregon Green 488 1,2-bis(o-aminofenoxi)etán-N,N,N',N'-tetraecetsav (BAPTA-1) fluoreszcens kalciumindikátor-festék (OGB) acetoximetilészter (AM) formájának (Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) alkalmazásával történt. A kalciumindikátor festéknek 50 μg-nyi mennyiségét 40 μl dimetil-szulfoxid-ban (DMSO) oldottuk fel, amelyből 1 mmol/l koncentrációjú törzsoldatot készítettünk. A törzsoldatot ezt követően -20°C-on, 4 μl-es mennyiségek formájában tároltuk. A törzsoldat készítéséhez felhasznált DMSO-t, ezen kívül kiegészítettük 0,5% pluronsavval és 0,1% Cremophor EL-lel. Az immunhisztokémiai jelölésekhez a megfelelő összetételű foszfát-puffert (PB), valamint foszfát- (PBS) és tris-pufferelt sóoldatot (TBS) alkalmaztunk (pH=7,4), végül pedig a fixáláshoz 4%-os paraformaldehid oldatot (PFA) használtunk.

### 2. Kísérleti állatok

Az állatkísérleteket a nemzetközi és magyar törvényi szabályozással összhangban a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága jóváhagyásával végeztük (40/2013. II. 14. Kormányrendelet az állatkísérletekről:

[http://net.jogtar.hu/jr/gen/hjegy\\_doc.cgi?docid=A1300040.KOR](http://net.jogtar.hu/jr/gen/hjegy_doc.cgi?docid=A1300040.KOR)).

Kísérleteinkhez 8-15 nap közötti C3H egereket használtunk (n=58), továbbá tdTomato fluoreszcens fehérjét expresszáló glutamát dekarboxiláz (glutamic acid decarboxylase-GAD2) (n=12) illetve kolin acetiltransferáz (choline acetyltransferase-ChAT) (n=17) egereket mindkét nemből. A floxed-stop-tdTomato (**Madisen és mtsai., 2010**; JAX Mice accession number 007905), GAD-cre (**Taniguchi és mtsai., 2011**; JAX number: 010802) és a ChAT-cre egér törzset a Jackson Laboratories-től vásároltuk meg (Bar Harbor, ME, USA) és az Élettani Intézet állatházában kereszteztük őket. Számos esetben használtunk fel kísérleteinkhez CB1 receptor knockout egereket (n = 9) illetve vad típusú alomtársaikat (n = 5), melyeket A. Zimmer-től kaptunk (Bonn, Németország; **Zimmer és mtsai., 1999**).

### 3. Túlélő agyszelet preparálása

Miután dekapitáltuk az állatot, eltávolítottuk az agyat, majd pedig Microm HM 650 V vibratóm (Microm International GmbH, Walldorf, Németország) segítségével 200 µm-es koronális középagyi szeletet vágunk, melynek preparálása mindvégig alacsony nátrium tartalmú aCSF-ben történt. A szeleteket végül normál nátrium tartalmú aCSF-fel feltöltött kamrában, 37°C-on inkubáltuk 1 órán keresztül, majd pedig szobahőmérsékletűre hűtöttük. Az inkubációs oldatot karbogén gázkeverékkel (95% O<sub>2</sub>; 5% CO<sub>2</sub>) buborékoltattuk, ezzel biztosítva az oldat megfelelő O<sub>2</sub> tartalmát és pH-ját.

### 4. Elektrofiziológia

A mérések során az agyszeleteket 40x-es nagyítású vízimmerziós objektívvel és Nomarski optikával felszerelt, Zeiss Axioskop mikroszkóp (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Németország) használatával tettük láthatóvá. A mérés alatt a szeleteket karbogénnel buborékoltatott, normál aCSF-fel áramoltattuk át (kb. 1ml/perc áramlási sebességgel). A méréshez használt mikroelektrodákat boroszilikát üvegapillárisból (GC150TF-10, Harvard Apparatus Ltd, Holliston, MA, USA), vertikális húzóval készítettük (P-830, Narishige, Tokio, Japán). A mérésekhez 5 MΩ ellenállású patch pipettákat készítettünk, melyet az alábbi anyagokat tartalmazó belső oldattal töltöttük meg: 120 mmol/l K-glukonát; 5 mmol/l NaCl; 10 mmol/l 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinétánszulfonsav (HEPES); 2 mmol/l etilén glikol tetraecetsav (ethylene glycol tetraacetic acid-EGTA); 0,1 mmol/l CaCl<sub>2</sub>; 5 mmol/l Mg-ATP; 0,3 mmol/l Na<sub>3</sub>-GTP; 10 mmol/l Na<sub>2</sub>-foszfo kreatinin; 8 mmol/l biocitin; pH 7,3. A teljes sejtes patch clamp vizsgálatokhoz Axopatch 200A erősítőt használtunk (Molecular Devices, Union City, CA, USA). Az összes mérés szobahőmérsékleten lett elvégezve. A mérések

elemzéséhez a Clampex 10.0 szoftvert használtuk (Molecular Devices, Union City, CA, USA), míg a mérések kielemezéséhez a Clampfit 10.0 (Molecular Devices) és a MiniAnalysis (Synaptosoft, Decatur, Georgia, USA) szoftvereket használtuk.

Patch-clamp technika teljes sejtes elrendezésében, áram-clamp üzemmódban, külső ingerlés nélkül, folyamatosan rögzítettük a neuronok membránpotenciálját. Az elemzéshez két, 120 s hosszúságú mérési szakasz került kiválasztásra: az egyik szakaszt a kontroll periódusból, a másikat pedig a szer hozzáadását követő 3 perc utáni időszakból választottuk ki. A membránpotenciál e periódusainak értékeiből hisztogramokat készítettünk, és azt a feszültségértéket tekintettük a nyugalmi membránpotenciálnak, amelyikhez a legtöbb adatpont tartozott. Hiperpolarizációnak vagy depolarizációnak a 2 mV-ot meghaladó membránpotenciál-változásokat tekintettük, mert a hasonló körülmények között, de szerek alkalmazása nélkül megfigyelt membránpotenciál-változások átlagos értéke  $2 \pm 0,52$  mV volt ( $n = 4$ ). Ehhez hasonlóan, az akcióspotenciál-tüzelési frekvencia spontán változásának átlagos értéke  $0,52 \pm 0,19$  Hz-nek bizonyult; és ennek alapján a 0,5 Hz feletti értékeket tekintettük a tüzelési frekvencia változásának.

## 5. Alkamazott szerek

A CB1 receptorok aktiválására, arachidonoil-2-chloroethylamide-t (ACEA) alkalmaztunk, 5  $\mu\text{mol/l}$  koncentrációban, míg a WIN55,212-2 1  $\mu\text{mol/l}$  koncentrációban került alkalmazásra. Az UCM707 (anandamid membrán transzport inhibitor) hatását 10  $\mu\text{mol/l}$ -es koncentrációban vizsgáltuk. Bizonyos kísérletekben a szeleteket folyamatosan perfundáltuk 10  $\mu\text{mol/l}$  NBQX-et és 50  $\mu\text{mol/l}$  DAP5-et tartalmazó nACSF-fel; (Tocris Cookson Ltd., Bristol, UK), 1  $\mu\text{mol/l}$  sztrichninnel, valamint 10  $\mu\text{mol/l}$  bikukullinnal, hogy blokkoljuk az ionotróp glutamát-, glicin- és GABA- receptorokat. A további kísérletekben 100  $\mu\text{mol/l}$  7-(hidroxi-imino) ciklopropa[b]króm-n-1a-karboxilát-etil-észter-t (CPCCOEt) és 10  $\mu\text{mol/l}$  2-metil-6-(fenil-etinil)-piridin-hidroklorid (MPEP)-et alkalmaztunk az 1-es és 5-ös típusú metabotróp glutamát receptorok (mGluR I-es csoport) blokkolására, míg az mGluR II-es receptor blokkolására 10  $\mu\text{mol/l}$  LY341495 használtunk. A spontán akcióspotenciál-tüzelést 1  $\mu\text{mol/l}$  tetrodotoxinnal (TTX) blokkoltuk. Más kísérletekben, a szeleteket 50 nmol/l ACEA-val 5-7 percig előinkubáltuk, mielőtt az 5  $\mu\text{mol/l}$  ACEA-t alkalmaztuk. Végül pedig, a muszkarinos agonista karbamilkolin-kloridot (karbakol) 50  $\mu\text{mol/l}$ -es koncentrációban használtuk.

## 6. Intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentráció mérése

Az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentráció méréshez, „calcium imaging” technikát használtunk. Kísérletünk során OGB-AM-et (Invitrogen-Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) tartalmazó festékekkel inkubáltuk a szeleteket. Ennek során a szeleteket egy normál aCSF-et tartalmazó Millicell CM sejttenyésztő edénykébe illeszthető kamrába helyeztük (Millipore Billerica, MA, USA). Ezt követően a szeleteket előinkubáltuk 120 µl mennyiségű, 33 µmol/l OGB-vel 25 percen keresztül (37°C, 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>), a sejtek festékekkel való megtöltődésének céljából. A sejtplazmába jutott festékekről, a sejt észterázai eltávolították az acetoxi metilészter (AM) csoportokat, így a festék polárisabbá vált és felhalmozódott a sejtben belül. A sejt által fel nem vett festék eltávolításának céljából a szeleteket visszahelyeztük a normál aCSF-et tartalmazó kamrába.

A szeleteket Zeiss Axioskop mikroszkóppal, 40x-es objektívvel (Carl Zeiss AG) tettük láthatóvá. A szeleteket a mérés során normál aCSF-fel folyamatosan perfundáltuk (1 ml/perc). A mikroszkóp egy olyan fluoreszcens képalkotó rendszerrel volt felszerelve, amely lehetővé tette a fluoreszcens jelek detektálását és a fluoreszcencia intenzitás időbeli változásának rögzítését (Till Photonics GmbH, Gräfeling, Németország). A fluoreszcens jelek detektálását egy CCD kamera (Sensi-Cam, PCO AG, Kelheim, Németország), a megfelelő fény kibocsátását pedig egy xenon izzót tartalmazó Polychrome V-ös fényforrás végezte (Till Photonics). A fluoreszcens festék gerjesztése 488 nm hullámhosszúságú fényvel történt. A fluoreszcens jelek elkülönítését és láthatóvá tételét Omega 505DRLPXR dikroikus tükör (Omega Optical Inc. Brattleboro, VT, USA) és egy emissziós filter biztosította (LP 515; Till Photonics). A kalciumkoncentráció-változások rögzítése alatt, 1,4 megapixel kamerát 8x8-as pixelkapcsolással (binning) használtuk, mely 344x260 pixel felbontású képeket eredményezett. A mintavételi frekvencia 10 Hz volt. Az adatrögzítés vizsgált paramétereit a Till Vision szoftverrel (4.0.1.3) vizsgáltuk, amely egy képalkotó szabályozóegységgel (ICU), volt összekötésben.

Ezzel párhuzamosan patch-clamp kísérleteket is végeztünk. Annak érdekében, hogy bizonyítsuk a lassú kalcium hullámok glia eredetét, teljes-sejt patch-clamp felvételeket is készítettünk mind áram-, mind feszültség-clamp üzemmódban. Ezeket a sejteket Alexa Fluor 594 (Invitrogen-Molecular Probes) is megtöltöttük a morfológiai azonosítás érdekében (n=4). Továbbá, loose-patch üzemmódban végeztünk méréseket, melynek során bizonyítottuk, hogy a lassú hullámok nem kapcsolódnak akcióspotenciál-tüzeléshez (n=8). Bizonyos kísérletekben

a metszeteket előinkubáltuk 1  $\mu\text{mol/l}$  thapsigarginnal 45 percen keresztül, hogy gátoljuk az asztrociták kalciumhullámainak.

A fluoreszcens kalciumkoncentrációk eredményét 16 bites TIF képsorozatok formájában exportáltuk a Till Vision nevű programból. A képsorozatok kiértékelése, az egyedi sejtek azonosításával és kijelölésével kezdődött („region of interest”/ROI). A következő lépésben számszerűsítettük a ROI-k átlagos fluoreszcenciaintenzitásainak változását. A nyugalmi fluoreszcencia értékének meghatározása mindig minimum 25 ciklus hosszú aktivitásmentes periódus fluoreszcenciaértékeinek átlagolásával ment végbe. A disszertáció ezen mérésekhez kapcsolódó ábráin bemutatott görbék esetében, minden fluoreszcens adatpontot ezen nyugalmi fluoreszcenciaértékhez ( $F_0$ ) hasonlítottuk, és azt százalékos formában is megadtuk. A kalciumhullámok frekvenciáját az individuális hullámok manuális értékelésével végeztük. Individuális kalciumhullámként definiáltuk azon fluoreszcenciaintenzitás-változásokat amelyek a nyugalmi fluoreszcencia 2%-ánál nagyobb pozitív kitérések voltak ( $2\% \Delta F/F_0$ ) és a csúcsuk elérése után legalább a nyugalmi fluoreszcencia 1%-át meghaladó csökkenést ( $1\% \Delta F/F_0$ ) mutattak.

## 7. A jelölt neuron láthatóvá tétele

Az elektrofiziológiai mérések során a neuronok biocitinnel lettek megtöltve. A szeleteket ezt követően 4% -os paraformaldehiddel 0,1 mol foszfát-pufferben ( $\text{pH} = 7,4$ )  $4^\circ\text{C}$ -on fixáltuk egy éjszakán át. A penetrációt Tris-pufferolt sóoldattal (8 mmol/l Tris bázis; 42 mmol/l Trizma-HCl; 150 mmol/l NaCl;  $\text{pH} = 7,4$ ) sikerült elérni, amely 0,1% Triton X-100-al és 10% szarvasmarha-szérummal (60 perc) volt kiegészítve. A szeleteket ezt követően streptavidin-konjugált Alexa 488-at tartalmazó foszfát-pufferben (1:300; Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, USA) inkubáltuk 90 percig. Azokban a mintákban, melyekben nem volt tdTomato expresszió, azokon kolin acetiltranszferáz (ChAT) immunhisztokémiát végeztünk el, a biocitin előhívás során kecske anti-ChAT (1:75 arányban; Millipore, Temecula, California, USA); és Texas Red nyúl-anti-kecske másodlagos antitestet alkalmazva (1:1000 hígításban; Vector Laboratories Inc., Burlingame, California, USA). A sejteket Zeiss LSM 510 konfokális mikroszkóppal tettük láthatóvá (Carl Zeiss AG).

## 8. Immunhisztokémia

Kísérleteink során három egeret használtunk a tdTomato fluoreszcens fehérjét ChAT függő módon expresszáló törzsből, illetve három egeret a C3H vad típusú egerekből. Az állatokat nátrium pentobarbitállal (50 mg/kg i.p.) túlaltattuk, majd pedig Tyrode oldatot (kevert oxigenizáltságú 95% O<sub>2</sub> és 5% CO<sub>2</sub>) áramoltattunk át az állaton transzkardiális perfúzió segítségével; melyet a fixálás céljából lecseréltünk 4%-os paraformaldehidre (melyet 0,1 M-os foszfát pufferben hígítottunk-PB pH 7.4). A fixálást követően a mesencephalont eltávolítottuk, majd utófixáltuk 4 órán keresztül, utána pedig 10 és 20%-os szukróz oldatot tartalmazó 0,1 molos PB oldatba helyeztük, míg le nem sülyedt. Annak érdekében, hogy fokozzuk az immunreagensek penetrációját, az eltávolított mesencephalont lefagyasztottuk. Ezt követően 50 µm-es vastagságú transzverziális szeleteket vágunk vibratóm segítségével, végül pedig a szeleteket átmostuk PB-vel.

Az **egyszeres immunhisztokémiai** protokoll alkalmas a CB<sub>1</sub> receptor eloszlásának tanulmányozására a PPN-ben. A kísérlet során, a szabadon úszó szeleteket előinkubáltuk nyúl anti-CB<sub>1</sub> antitesttel (1:5000 hígításban, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) 48 órán át 4°C-on, majd ezt követően nyúl ellen termeltetett kecske IgG Alexa Fluor 647-tel (1:1000 hígításban, Invitrogen, Eugene, OR, USA) konjugált antitestet adtunk hozzá. Mielőtt az antitestet hozzáadtuk volna, azelőtt 10%-os normál kecskeszérumban (Vector Labs., Burlingame, CA, USA) tartottuk 50 percen keresztül. Az ellenanyagokat 10 mmol/l - TBS-ben (pH=7,4) hígítottuk, amely 1%-os normál kecskeszérumot (VectorLabs., Burlingame, CA, USA) is tartalmazott. Végül a szeleteket tárgylemezre helyeztük és Vectashielddel (Vector Labs., Burlingame, CA, USA) lefedtük.

**Kettős immunhisztokémiai** jelölés során, a CB<sub>1</sub> receptor és az asztrociták jellegzetes markerének a GFAP-nek (glial fibrillary acidic protein) a kolokalizációját tanulmányoztuk. A szabadon úszó szeleteket először beinkubáltuk egy kevert antitestet, nyúl anti-CB<sub>1</sub> receptort (1:2000 hígításban, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) és egér anti-GFAP-t (1:1000 hígításban, Millipore, Temecula, CA, USA) tartalmazó oldattal. A szeletek elsődleges antitesttel történő beinkubálása, 2 napon keresztül 4°C-on történt, majd pedig a másodlagos antitestek, a nyúl ellen termeltetett kecske IgG Alexa Fluor 647 (1:1000 hígításban, Invitrogen, Eugene, OR, USA) konjugált antitest, valamint az egér ellen termeltetett kecske IgG Alexa Fluor 488 konjugált antitest (1:1000 hígításban, Invitrogen, Eugene, OR, USA) 1 éjszakán keresztül inkubálódtak a szeleteken. Mielőtt a szeletek megkapták az antitest

kezelést, előinkubáltuk őket 50 percen keresztül 10%-os normál kecskeszérummal (Vector Labs., Burlingame, CA, USA). Az antitesteket PBS-ben hígítottunk (pH=7,4), amely 1%-os normál kecskeszérumot (VectorLabs., Burlingame, CA, USA) is tartalmazott. Végül a szeleteket tárgylemezre helyeztük és Vectashielddel (Vector Labs., Burlingame, CA, USA) lefedtük.

Az 1  $\mu\text{m}$  optikai vastagságú szeleteket Olympus FV1000 konfokális mikroszkóppal szkenneltük. A scanneléshez 60x-os PlanApo N olajimmerziós objektívet (NA. 1.42) és a FV10-ASW szoftvert (Olympus) használtuk. A beolvasott képek elemzéséhez Adobe Photoshop CS6 szoftvert használtunk. Minden egyes konfokális felvétel ugyanazon a konfokális beállításon lett elvégezve, beleértve a lézer erősséget, a pinhole-t, az erősítést és a pixelméretet.

Az elsődleges antitest, a CB1 receptorral szembeni antitest (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) specificitásának megerősítése érdekében előzetesen CB1 knockout egereken **(Hegyi és mtsai., 2009)** is elvégezték a kísérletet. A specificitás ellenőrzésére a szabadon úszó szeletekre a protokoll szerint alkalmaztak antitestet. Más esetekben vad típusú mintát alkalmazva az antitestet lecserélték 1%-os normál kecskeszérumra. Egyik esetben sem volt megfigyelhető CB1 immunpozitivitás.

A CB1 receptor és az asztrocita-marker (GFAP-IR) kolokalizáció vizsgálatát több festett metszeten elemeztük. A kvantitatív elemzés során 3 különböző állatból, állatonként 3 metszetre egy 10x10-es szabványú rácshálót helyeztünk, amelyben egy rác 50x50  $\mu\text{m}$  nagyságú volt, és egy négyzet egységesen 5  $\mu\text{m}$ -nek felelt meg. Ennek során vizsgáltuk az axonok, illetve a gliasejtek markereit. A kvantitatív analízishez összesen 9 rácshálón belül elhelyezkedő immunopozitivitások kolokalizációját számoltuk össze és értékeltük statisztikailag. A mennyiségi adatok kiszámítása átlagértékek, és a standard eltérések (SEM) kiszámításán alapult a vizsgált kilenc szakaszból.

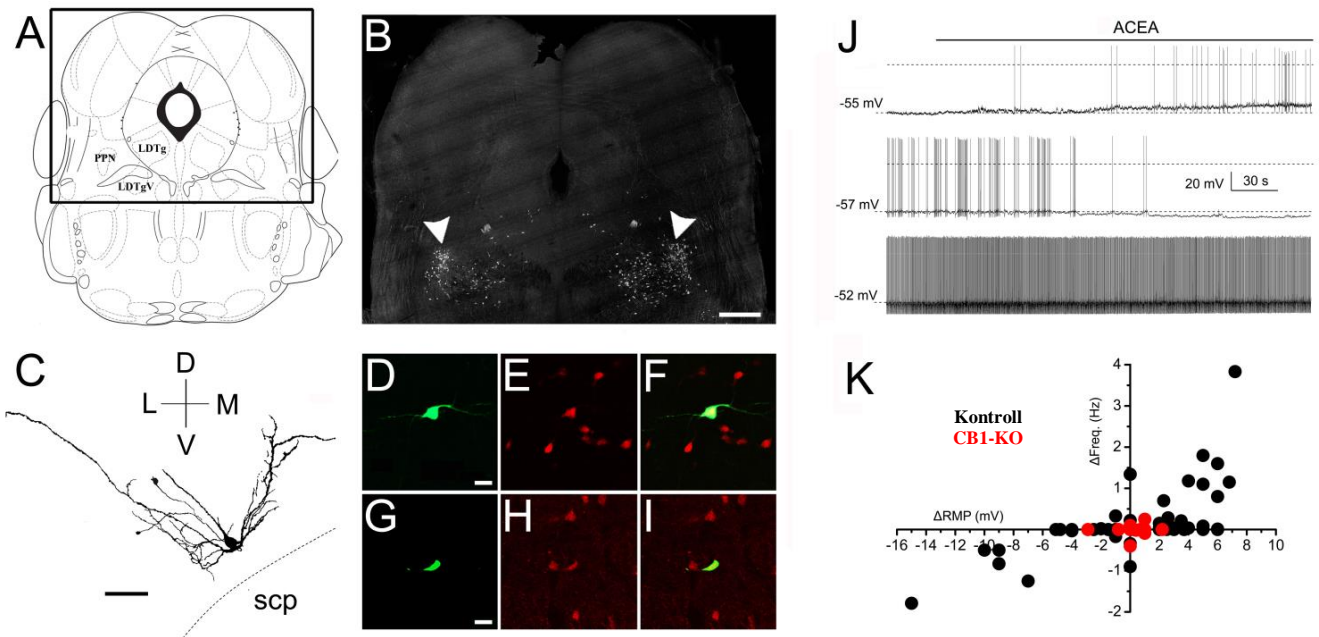
## 9. Statisztikai analízis

Minden adatot átlag  $\pm$  standard hiba (SEM) formájában tüntettünk fel. Két független adathalmaz központi tendenciáinak (átlag vagy medián) összehasonlítására t-próbát vagy Mann–Whitney féle U próbát használtunk. Több adathalmaz összehasonlítására ANOVA-tesztet vagy Kruskal–Wallis ANOVA on Ranks tesztet használtunk, amit egy post hoc teszt követett (Tukey- vagy Dunn- teszt) a páronkénti különbségek vizsgálatára. A kezelések előtti és utáni értékek összehasonlítására kétmintás t-próbát használtunk. A nyugalmi membránpotenciál vagy a tüzelési frekvencia normális eloszlást nem mutató adatainak elemzéséhez nem parametrikus próbát használtunk. Ezekben az esetekben a paraméterek változásának abszolút értékeivel számoltunk. Amikor a karbakolra és ACEA-ra bekövetkező membránpotenciál- és tüzelésifrekvencia-változásokat hasonlítottuk össze, a neuronokat a válaszaik (depolarizáció, hiperpolarizáció, válaszhiány) szerint csoportosítottuk 2 mV-os küszöbértéket használva; és Fisher-féle próbát használtunk a p értékek Bonferroni korrekciójával. Az egyes adatpárok összehasonlításának elvégzéséhez a Bonferroni korrekciót és a p értéket együttesen használtuk. Hasonló megközelítést használtak a frekvenciaváltozásokra 0,5 Hz-es küszöbértékkel. Az adathalmazok közti általános korreláció vizsgálatára a Spearman-féle koefficienszt használtuk (S). A szignifikancia küszöbének a  $p=0,05$ -ös értéket tekintettük. A számítások elvégzésére SigmaPlot 12 (Systat Software, San Jose, CA, USA) és GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) programot használtunk. A karbakolra és az ACEA-ra kialakuló membránpotenciál változások elemzéséhez és feltüntetéséhez az OriginPro 8-as szoftvert (OriginLab Corporations, Northampton, Massachusetts, USA) használtuk.

## Eredmények

### 1. A CB1 receptor aktivációja heterogén választ váltott ki a PPN neuronjaiból

A CB1 receptor stimulációjának hatását a PPN neuronjainak membránpotenciáljára és tüzelési mintázatára teljes sejtés elrendezésben, áram-clamp üzemmódban végzett patch-clamp mérésekkel vizsgáltuk (n=46). A sejtek elhelyezkedésének és morfológiájának azonosításához biocitin jelölést használtunk. A vizsgált sejtek a pedunculus cerebellaris superioritól dorsalisán (100  $\mu\text{m}$ -en belül) és a lemniscus lateralistól mediálisan helyezkedtek el; mind a pars compacta, mind a pars dissipata területéről (**13. ábra, A-I**). Egyes esetekben ChAT- és GAD65-függő módon tdTomato fluoreszcens fehérjét expresszáló idegsejteken végeztünk méréseket (**13. ábra, D-I**). Az idegsejtek átlagos nyugalmi membránpotenciál értéke  $-57,4 \pm 1,3$  mV volt. A neuronok 54%-ánál spontán akcióspotenciál-tüzelés volt megfigyelhető, melynek átlagos frekvenciája  $1,85 \pm 0,35$  Hz volt. Ezen sejtek nyugalmi membránpotenciálja  $-53,6 \pm 1,75$  mV volt (n =25). A sejtek 5  $\mu\text{mol/l}$  ACEA hatására különböző módon reagáltak: egyesek depolarizálódtak és megnövelték az akcióspotenciál-tüzelési frekvenciájukat, mások pedig hiperpolarizáltak és csökkent a tüzelési frekvenciájuk vagy teljesen meg is szűnt a spontán aktivitásuk (**13. ábra, J,K**). Ezenkívül voltak olyan sejtek, amelyek nem reagáltak ACEA-ra. A CB1 receptor deficiens egerek PPN neuronjain csak nagyon kis mértékű, a vad típusú mintákon mért változásoknál szignifikánsan kisebb membránpotenciál- és tüzelési frekvencia változásokat láttunk (n=13; **13.ábra, K**).

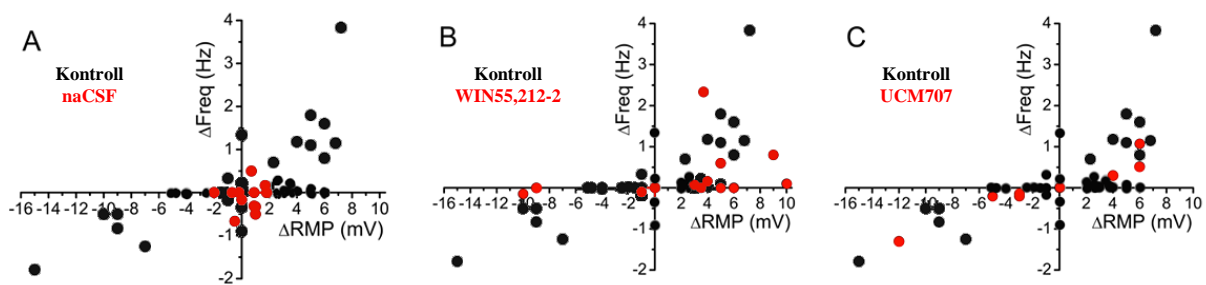


**13. ábra: A CB1 receptor agonista ACEA heterogén válaszokat vált ki a PPN neuronjain.**  
**A.** sematikus rajz egy coronalis közepagyji szeletről (Paxinos és Franklin, 2004 alapján). A fekete négyzettel jelölt területet a B ábrán tüntettük fel. PPN-nucleus pedunculopontinus, LDTg-nucleus laterodorsalis tegmentalis, LDTgV-nucleus laterodorsalis tegmentalis, ventrális rész. **B.** A PPN régióját is tartalmazó coronalis közepagyji metszet. A tdTomato-t expresszáló kolinerg neuronokat nyílhegy jelzi. Kalibrációs egyenes: 500  $\mu\text{m}$ . **C:** Egy biocitinnel jelölt PPN neuron rajza, mely a pedunculus cerebellaris superior dorsalis részén helyezkedik el (pedunculus cerebellaris superior=SCP, szaggatott vonal). Kalibrációs egyenes: 100  $\mu\text{m}$ . **D-F.** Azonosított kolinerg neuron. **D.** Biocitin jelölés. **E.** ChAT-függő tdTomato expresszió **F.** Egymásra vetített kép. **G-I.** Azonosított GABAerg neuron. **G:** Biocitin jelölés. **H.** ChAT-függő tdTomato expresszió **I.** Egymásra vetített kép, a kalibrációs egyenes **D-I:** 20  $\mu\text{m}$ . **J.** A CB1 receptor agonista ACEA hatására a PPN neuronjai eltérő módon reagáltak: depolarizáció és tüzelési frekvencia növekedés (fent), hiperpolarizáció és tüzelési frekvencia csökkenés (középen), valamint a válasz hiánya (lent). **K.** Az összes adat összefoglalása a vad típusú egereken (fekete pontok; n=46), illetve a CB1 receptor knockout egereken (piros pontok; n=13) történt mérés alapján. Az ACEA hatására történő nyugalmi membránpotenciál változás az x tengelyen, míg a tüzelési frekvencia változása az y tengelyen lett feltüntetve.

Annak érdekében, hogy kizárjuk azt a lehetőséget, hogy a látott membránpotenciál-változások csak spontán fluktuáció eredményei, 13 olyan neuronon mértünk legalább 7 percen keresztül naCSF-ben, egyéb szer alkalmazása nélkül. Ezekben az esetekben, a membránpotenciál és a tüzelési frekvencia értékeket úgy határoztuk meg, hogy az utolsó 2 perc értékeit viszonyítottuk az első 2 perc értékéhez. A spontán nyugalmi membránpotenciál ingadozásának nagysága szignifikánsan kisebbnek bizonyult ( $1,031 \pm 0,183$  mV), mint az ACEA hatására megfigyelt ( $4,322 \pm 0,477$  mV;  $p < 0,001$ ; **14. ábra, A**). A CB1 knockout egerek neuronjain végzett mérések során szintén kisebb volt a nyugalmi membránpotenciál-

változás mértéke, mint a vad típusú egyedek esetén ( $0.838 \pm 0.243$  mV,  $p < 0,0001$  vs. vad típus, ACEA;  $p > 0,999$  vs. vad, típus, kezelés nélkül). Négy további esetben a membránpotenciál és az akciópotenciál-tüzelés változásait kontroll körülmények között, 10 percen keresztül regisztráltuk, és a membránpotenciál és tüzelési frekvencia értékeit hasonlítottuk össze az első és az utolsó percben. A nyugalmi membránpotenciál átlagos változása  $2 \pm 0,52$  mV, míg tüzelési frekvencia átlagos változása  $0,52 \pm 0,19$  Hz volt. Egy másik kannabinoid receptor agonista, a WIN55,212-2 ( $1 \mu\text{mol/l}$ ;  $n=16$ ), és az anandamid membrán transzporter inhibitor UCM707 ( $10 \mu\text{mol/l}$ ;  $n=13$ ) alkalmazása is hasonló hatásokat váltott ki. Az UCM707 egy anandamid membrántranszporter (ANT) gátló, amely a zsírsavamid hidroláz (FAAH) enzimet is gátolja. Ez az enzim elengedhetetlen az endokannabinoidok lebontásához. A zsírsavamid hidroláz (FAAH) végzi az anandamid lebontását arachidonsavra és etanolaminra, így mivel nem történik meg az anandamid lebontása, az anandamid felszaporodik az extracelluláris térben. Az anandamid membrántranszporter (ANT) egy feltételezett, jelenleg még nem ismert fehérje, ami az anandamid facilitált diffúziójáért lehet felelős. Jelenleg mindössze indirekt kísérletes bizonyítékok alapján ismert (Chicca és mtsai., 2012). Az alkalmazott szerek hatásai között nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a nyugalmi membránpotenciál ( $p=0,7308$ ), illetve a tüzelési frekvencia változásban ( $p=0,6611$ ; **14. ábra, B, C**).

További feszültség-clamp mérések során ( $n=28$ ) a membránpotenciált  $-60$  mV-os tartófeszültségen tartva,  $5 \mu\text{mol/l}$  ACEA alkalmazását követően 11 esetben aktiválódtak a befelé irányuló áramok ( $-24,5 \pm 4,4$  pA), 7 esetben pedig a kifelé irányuló áramok aktiválódtak ( $19 \pm 1,9$  pA), viszont további 10 esetben a tartóáram nem változott.

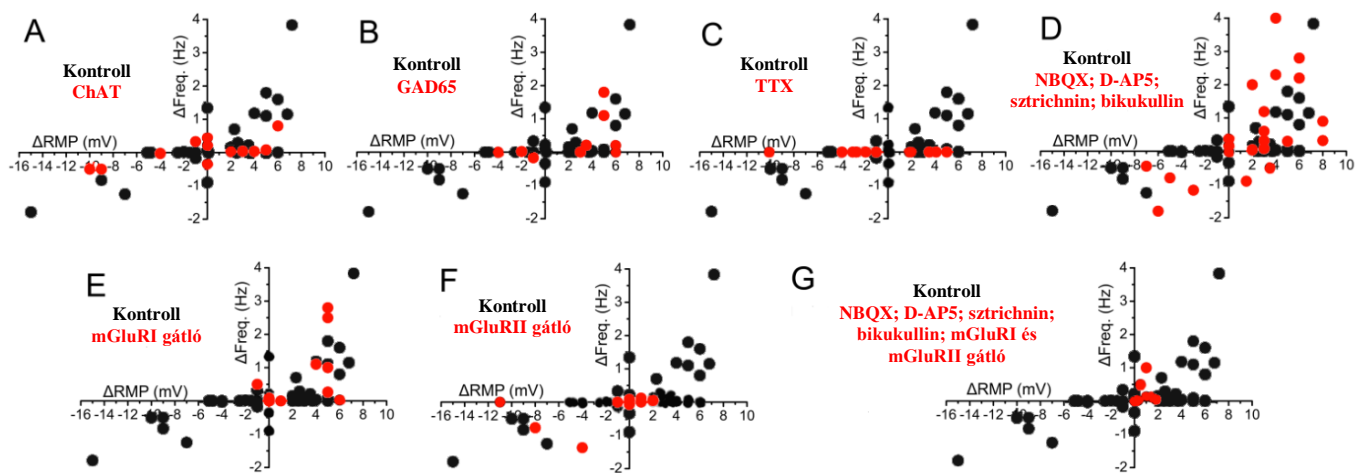


**14. ábra.** A spontán változások és más CB1 receptor agonisták (piros szimbólumok) összehasonlítása az ACEA által kiváltott változásokkal (fekete szimbólumok). **A.** A spontán membránpotenciál- és tüzelési frekvencia változásai (piros) és az ACEA által okozott változások (fekete). **B.**  $1 \mu\text{mol/l}$  WIN55,212-2 által létrehozott membránpotenciál- és tüzelési frekvencia változásai (piros) és az ACEA által okozott változások (kontroll). **C.**  $10 \mu\text{mol/l}$  UCM707 (anandamid membrán transzport gátlószer) által okozott membránpotenciál- és tüzelési frekvencia változásai (piros) és az ACEA hatására létrejövő változások (fekete).

A további kísérletek során megvizsgáltuk, hogy a megfigyelt heterogén membránpotenciál-változások háttérében milyen receptorok, hatások állnak. A megfigyelt heterogén válasz potenciálisan függhet az adott neuron típusától. A különbségek vizsgálata céljából mértünk tdTomato-t kifejező kolinerg és GABAerg neuronokon is. Mindkét sejtcsoport esetében ugyanúgy háromféle választ tapasztaltunk ACEA hatására; azonban az arányok a megfigyelt válaszok tekintetében különbözőek voltak. A kolinerg sejtek azonos arányban depolarizáltak, hiperpolarizáltak vagy pedig nem reagáltak ACEA hatására, a GABAerg neuronok esetében viszont a sejtek főként depolarizálódtak **(15. ábra, A, B)**. Kilenc kolinerg neuronból négyenél depolarizációt, két neuronnál hiperpolarizációt láttunk, míg három további esetben nem tapasztaltunk membránpotenciál változást. A tíz GABAerg neuronból hétnél depolarizációt, háromnál pedig, hiperpolarizációt tapasztaltunk.

A továbbiakban arra kerestünk választ, hogy a neuronális aktivitás blokkolása befolyásolja-e a CB1 receptor stimulációra látott válaszokat, azaz neuronális hálózaton érvényesülő hatást vagy közvetlen poszt/extraszinaptikus hatást látunk. 1  $\mu\text{mol/l}$  TTX alkalmazásakor vagy a gyors szinaptikus neurotranszmisszió gátlásakor használt koktél (10  $\mu\text{mol/l}$  NBQX; 50  $\mu\text{mol/l}$  D-AP5; 1  $\mu\text{mol/l}$  sztrichnin; 10  $\mu\text{mol/l}$  bikukullin) alkalmazásakor nem tapasztaltunk változást az ACEA által kiváltott membránpotenciál-változásban **(15. ábra, C, D)**.

A következő kísérletsorozatban a szeleteket az I-es vagy a II-es csoportú metabotróp glutamát receptorok (mGluR) antagonistáival kezeltük (10  $\mu\text{mol/l}$  2-metil-6-(feniletinil)piridin (MPEP) és 100  $\mu\text{mol/l}$  7-(hidroxi-imino)ciklopropa[b]króm-n-1a-karboxilát-etil-észter-t (CPCCOEt), vagy 10  $\mu\text{mol/l}$  LY341495-t alkalmazva). Az I-es típusú mGluR blokkolókkal kezelt neuronok depolarizálódtak vagy pedig nem reagáltak ACEA hatására **(15. ábra, E)**, de a II-es típusú mGluR blokkoló hatására az ACEA néhány esetben hiperpolarizációt okozott, és a depolarizáció gyakorlatilag elmaradt **(15. ábra, F)**. A gyors szinaptikus neurotranszmissziót blokkoló koktél (l. fent) és az mGluR I-es és II-es antagonistákat együtt alkalmazva az ACEA nem eredményezett szignifikáns változást a nyugalmi potenciálban és tüzelési frekvenciában **(15. ábra, G)**.

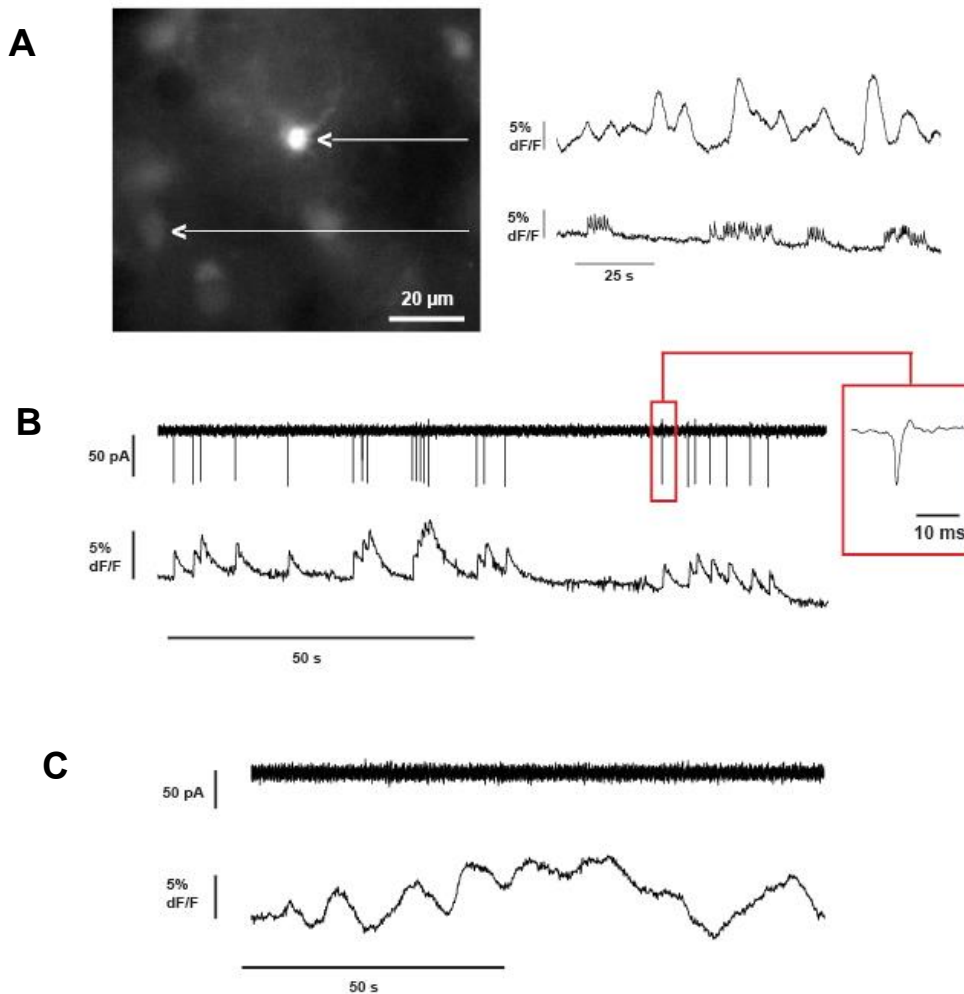


15. ábra. A PPN neuronjain kiváltott kannabinoid hatás sejttípus-specifikus különbségei és farmakológiai sajátosságai. A fekete pontok jelölik a neuronok CB1 receptor agonisták hatására adott válaszát kontroll körülmények között, míg a piros pontok a sejtek egy adott típusú farmakon alkalmazása melletti vagy egy definiált populáció válaszát jelölik. Az x tengely jelzi a membránpotenciál-változást, az y tengely pedig a tüzelésifrekvencia-változást. **A.** A CB1 receptor agonista ACEA hatása a kolin-acetiltransferáz (ChAT) pozitív (kolinerg; n=12) és a **B** panelen látható GAD65 pozitív (GABAerg; n=9) neuronokra. **C.** 1  $\mu\text{mol/l}$  tetrodotoxin (TTX) vagy a **D** panelen látható gyors szinaptikus neurotranszmisszió blokkolók (10  $\mu\text{mol/l}$  NBQX, 50  $\mu\text{mol/l}$  D-AP5, 1  $\mu\text{mol/l}$  sztrichnin, 10  $\mu\text{mol/l}$  bikukullin) hatása az ACEA által okozott változásokra (n=13; p=0,603; n=24). **E.** Az I-es típusú metabotróp glutamát receptor antagonistákkal (100  $\mu\text{mol/l}$  CPCCOEt, 10  $\mu\text{mol/l}$  MPEP) történő előinkubálás során, ACEA hatására bekövetkezett változások (n=12). **F:** A II-es típusú metabotróp glutamát receptor antagonista (10  $\mu\text{mol/l}$  LY341495) hatása az ACEA által kialakított változásokra (n=10). **G.** A gyors szinaptikus neurotranszmisszió és mGluR blokkolók hatása az ACEA által előidézett változásokra.

## 2. A CB1 receptor aktivációja megváltoztatja az asztrociták $\text{Ca}^{2+}$ hullám frekvenciáját

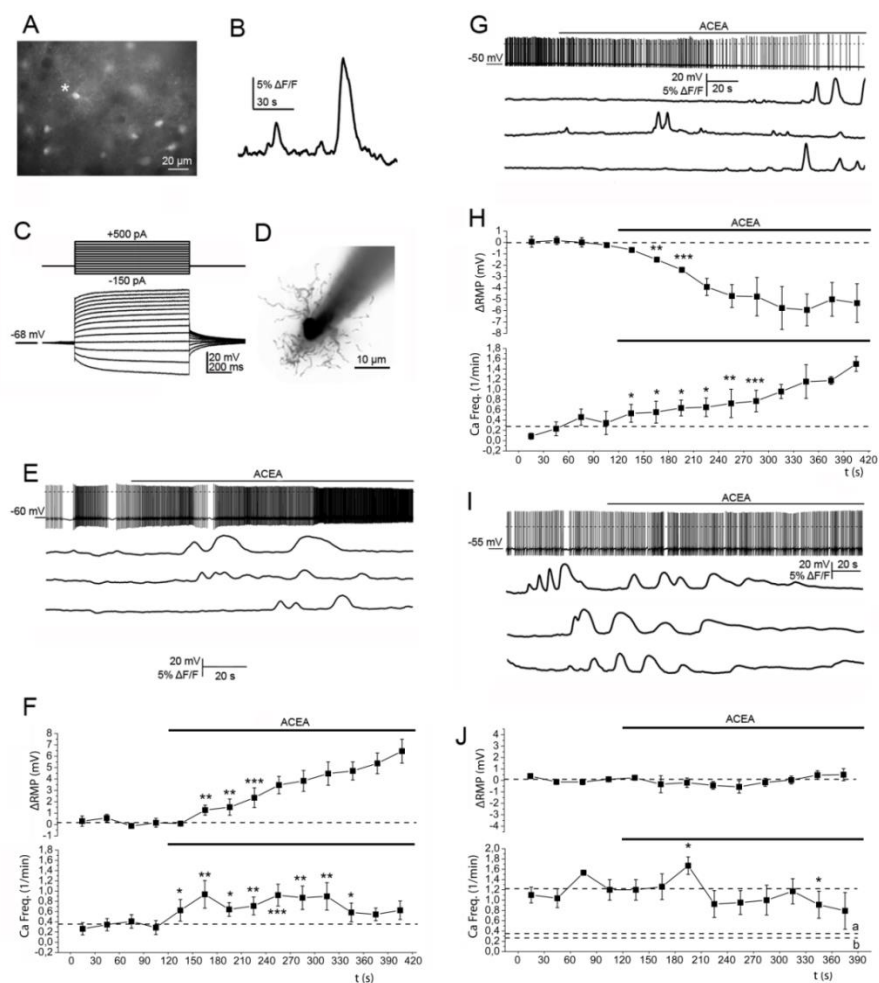
Mivel a gyors szinaptikus ingerületátvitel és akciós potenciális tüzelés gátlása nem szüntette meg a kannabinoid-indukált neuronális membránpotenciál változást; megvizsgáltuk, hogy az asztrociták CB1 receptoron keresztüli aktivációja, hatással van-e a neuronális aktivitásra. A szeleteket OGB kalciumérzékeny festékkel inkubáltuk, és mértük a fluoreszcenciaintenzitás-változást. Először is, azt szerettük volna bizonyítani, hogy a lassú kalciumhullámot produkáló sejtek a PPN-ben is gliasejteknek bizonyulnak, mint azt korábbi eredmények a nucleus cochlearisban (Kószeghy és mtsai., 2012), és a cortexben (Nimmerjahn és mtsai., 2004) már bizonyították. Amikor teljes sejt (n=4), vagy loose-

patch (n=8) elrendezésben mértünk a lassú kalciumhullámokat mutató sejtekről, akciós potenciál egyik esetben sem volt megfigyelhető (**16. ábra**). A sejtek morfológiájának meghatározásához Alexa 594 fluoreszcens festékkel töltöttük meg a sejteket (**17. ábra, A-D**). Továbbá, a lassú kalcium hullámok TTX jelenlétében is kimutathatók voltak, viszont eltűntek thapsigargin alkalmazása során (lásd **18. ábra, E, F**). A gyors kalciumjelek minden esetben akciós áramokkal egy időben jelentek meg (**16. ábra**).



**16. ábra. Gyors és lassú kalcium jelek a PPN-ben.** **A.** A PPN OGB-töltést követő fluoreszcens mikroszkópos képe. Ilyen körülmények között lassú kinetikájú és gyors kalcium jeleket is mértünk a magban (lásd jobb oldal). **B.** Egy gyors típusú kalciumjelet adó sejt intracelluláris kalciumkoncentráció-változásainak és tüzelési mintázatának szimultán nyomonkövetése. A tüzelési mintázatot loose patch üzemmódban követtük nyomon. Látható, hogy minden gyors típusú jel egy akciós árammal egy időben figyelhető meg (a pirossal kiemelt akciós áram nagy időbeli felbontással is látható). **C.** Egy lassú típusú kalciumjelet adó sejt elektromos aktivitásának és IC kalcium koncentráció változásának nyomonkövetése. Figyeljük meg, hogy a lassú kalciumhullámokkal egyidőben és ezen sejteken egyáltalán nem lehetett akciós áramot detektálni.

Az ezt követő kísérletekben, a neuronális és gliális aktivitást egyszerre követtük nyomon: az OGB-vel előinkubált szeletben current-clamp konfigurációban mértünk egy neuronon, illetve ezzel párhuzamosan a neuron szómájának 50  $\mu\text{m}$ -es környezetében, 5-21 töltött sejten mértük a kalciumhullámok frekvenciaváltozásait. A neuronon kialakuló 2 mV-ot meghaladó depolarizációt a kalciumhullámok frekvencianövekedése előzte meg és követte a környező asztrocitákon (**17. ábra, E, F**). A környező asztrocitákban ezekben az esetekben a kezdeti kis frekvenciájú spontán tevékenység ACEA alkalmazását követően a kétszeresére emelkedett körülbelül 4 percen át, majd fokozatosan visszatért az eredeti értékre (**17. ábra, F**). A hiperpolarizálódó neuronok közelében elhelyezkedő asztrociták viszont ACEA hatására folyamatos kalciumhullám-frekvencianövekedést mutattak (**17. ábra, G, H**). Az ACEA alkalmazására nem reagáló neuronok körüli asztrociták a szer alkalmazása előtt is magas kalciumhullám-frekvenciát mutattak, ami nem változott szignifikánsan a CB1 receptor agonista alkalmazása alatt sem (**17. ábra, I, J**).

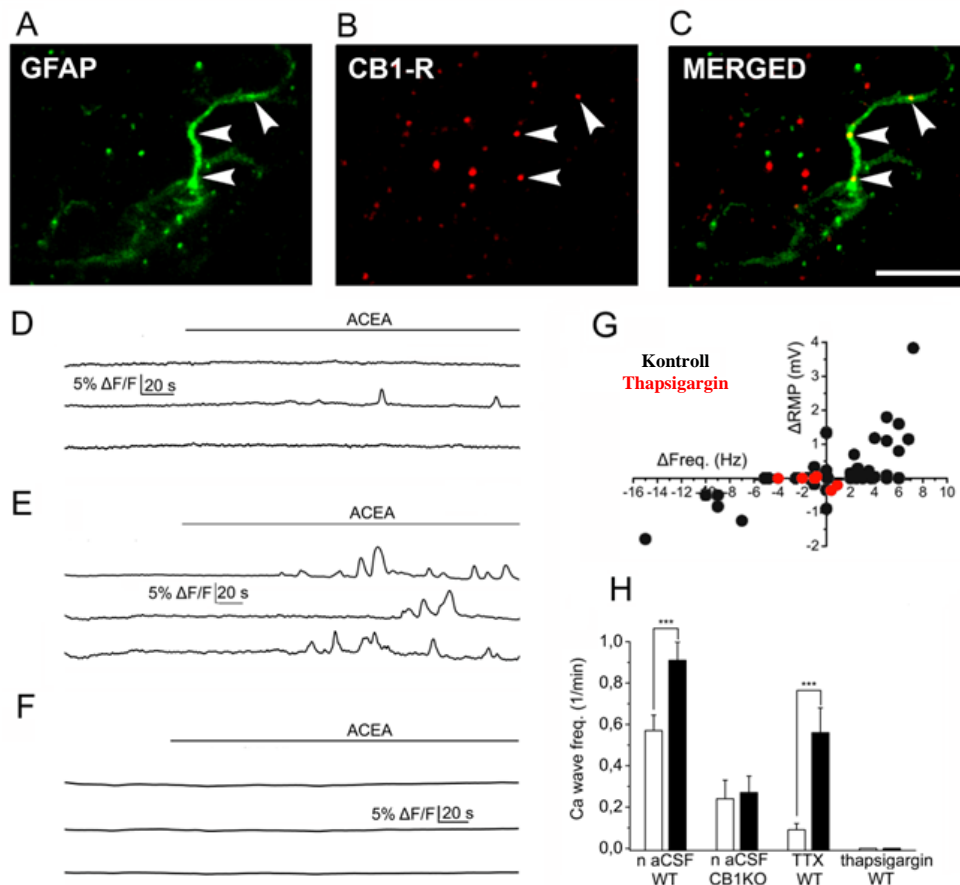


17. ábra. A jelmagyarozatot l. a túloldalon.



Az asztrocitákon megfigyelt változások annak is lehetnek a következményei, hogy a neuronális aktivitás változása miatt azok is megváltoztatják az aktivitásukat. Ennek a lehetőségnek a megvizsgálására vad típusú egereken alkalmaztuk TTX-et annak érdekében, hogy gátoljuk a neuronális akcióspotenciál-tüzelést. Az ACEA alkalmazását megelőzően, TTX jelenlétében szignifikánsan alacsonyabb volt az asztrociták kalciumhullám-frekvenciája, mint a kontroll körülmények között (**18. ábra, E, H**). Ennek az állhat a hátterében, hogy a neuronális aktiváció gátlásának egyik következménye, hogy a neuronokból történő aktivitásfüggő neurotranszmitter-felszabadulás jelentősen csökken, és ezáltal az asztrociták neurotranszmitter-receptorai sem aktiválódnak. Azonban amikor ACEA-t alkalmaztunk, szignifikánsan megnövekedett a kalciumhullám-frekvencia TTX jelenlétében (**18. ábra, E, H**).

Ezután azt vizsgáltuk, hogy az asztrociták gátlása megakadályozza-e a neuronok CB1 receptor agonisták hatására kialakuló membránpotenciál változását. Ehhez a vad típusú egerekből származó szeleteket 45 percig thapsigarginnal inkubáltuk (1  $\mu\text{mol/l}$ ), amely kiürítette a sejten belüli kalciumraktárakat (**Navarrete és Araque 2008, 2010**), majd az ezt követő 10 percen belül végeztünk méréseket. Mint az várható volt, miután thapsigarginnal előinkubáltuk a szeleteket, nem tapasztaltunk lassú kalciumhullámokat (n=58; **18. ábra, F, H**). Ezzel párhuzamosan, az ACEA-ra bekövetkező neuronális membránpotenciál- és tüzelési frekvencia-változások is elhanyagolhatóak voltak; az előinkubálás nélküli választól szignifikánsan különböztek (n=7; **18. ábra, G**). A neuronális válasz hiánya nem a neuronok thapsigarginnal való gátlásának a következménye volt, mivel 10  $\mu\text{mol/l}$  glutamát alkalmazása  $9,43 \pm 4,9$  mV depolarizációt és  $1,64 \pm 1,05$  Hz tüzelésifrekvencia-növekedést eredményezett (n=4).

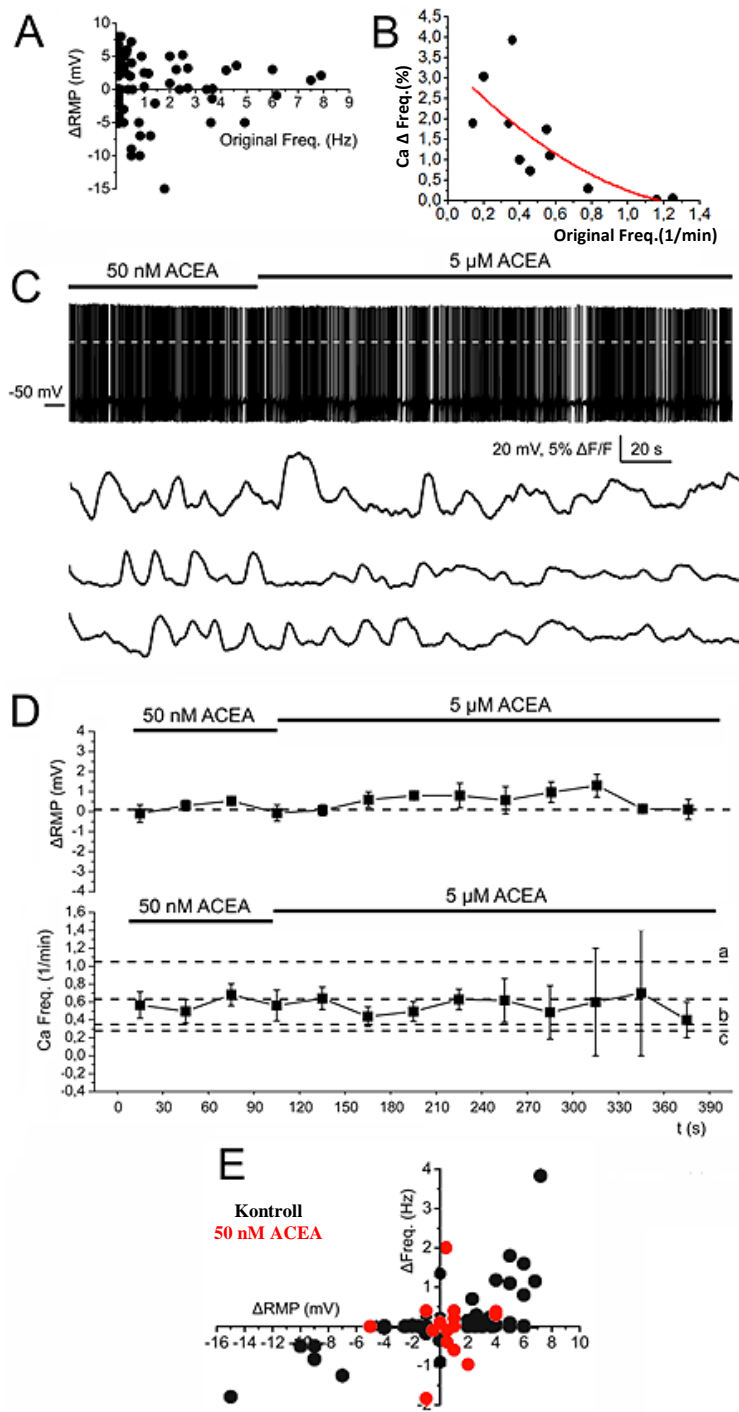


18. ábra. Az asztriciták CB1 receptorai felelősek az ACEA-ra bekövetkező neuronális membránpotenciál-változásokért. **A-C:** 1 μm optikai vastagságú felvétel a PPN területéről, mely az asztricitán elhelyezkedő GFAP (**A**) és a CB1 receptor (**B**) közötti kolokalizációt mutatja. A kettős jelölést mutató összesített képen (**C**) a nyílhegyek jelölik a kolokalizációt. A CB1 pozitív területek  $21,28 \pm 1,91\%$ -a esett egybe GFAP-pozitív területekkel (624 képpont 3 állatból). Kalibrációs egyenes: 5 μm. **D.** CB1 knockout egerekben megfigyelt lassú kalciumhullámok. A CB1 receptor agonista ACEA (5 μmol/l) nem változtatta meg az asztriciták kalciumhullámainak gyakoriságát a CB1 receptor knockout egerekben. **E.** A tetrodotoxin nem akadályozta az asztriciták kalciumhullámainak frekvencianövekedését ACEA alkalmazást követően. **F.** A thapsigarginnal való előinkubálás csökkenti a kontroll körülmények között tapasztalt kalciumhullámok frekvenciáját és megakadályozza az ACEA alkalmazására kialakuló frekvencianövekedést. **G** A thapsigarginnal történő előinkubáció jelentősen csökkenti az idegsejtek membrán potenciál változását ( $p=0,0066$ ;  $n=7$ ; RMP nyugalmi potenciál, Freq tüzelési frekvencia, fekete pontok: előinkubálás nélküli minta, piros pont: thapsigargin előinkubálás). **H.** Az asztriciták kalciumhullámainak frekvenciaváltozása kontroll körülmények között (üres oszlopok) és ACEA alkalmazást követően (fekete oszlopok). A vad típusú állatokban az ACEA nagymértékű kalciumhullám-frekvencia növekedést váltott ki ( $0,57 \pm 0,07$ /perc-ről  $0,91 \pm 0,09$ /percig;  $p=0,001$ ). A CB1 KO egerekben mért kalciumhullám-frekvencia szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a vad típusú egerekben ( $0,24 \pm 0,09$ /perc;  $p=0,0064$ ,  $n=73$ ), és az ACEA hatására bekövetkező frekvencianövekedés sem volt szignifikáns ( $0,27 \pm 0,08$ /perc;  $p=0,39$ ). TTX jelenlétében, a vad típusú állatokban a kalciumhullámok frekvenciája kontroll körülmények között alacsonyabb volt ( $0,09 \pm 0,03$ /perc;  $p=0,0004$  a kontroll naCSF-hez képest;  $n=53$ ), de ACEA hatására nagymértékű frekvencianövekedést tapasztaltunk ( $0,56 \pm 0,12$ /perc;  $p=0,0001$ ). A thapsigargin csökkentette mind a kontroll körülmények között kialakuló, mind az ACEA hatására kialakuló kalciumhullám-frekvenciát ( $n=58$ ).

#### 4. A CB1 agonisták hatása függ a neuronok és asztrociták nyugalmi aktivitásától

A következő kísérletsorozatban azt vizsgáltuk, hogy, egyes neuronok miért nem reagálnak az ACEA alkalmazására **(lásd 13. ábra, J)**.

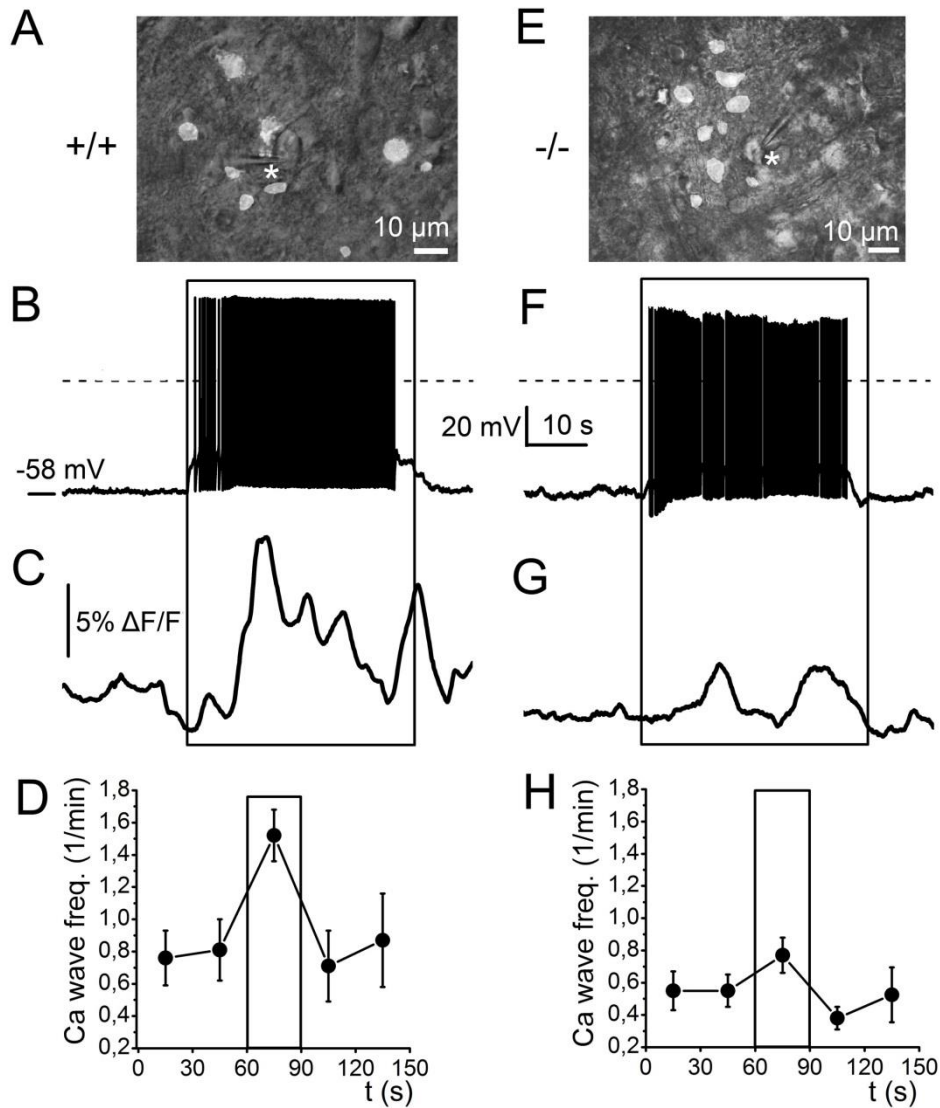
Azt találtuk, hogy az ACEA-ra adott membránpotenciál-változás nagysága fordítottan arányos volt a kontroll körülmények között megfigyelt tüzelési frekvenciával: alacsonyabb kiindulási frekvenciával rendelkező neuronokon az ACEA kifejezettebb membránpotenciál-változásokat hozott létre, míg azon sejtek membránpotenciálját, melyek nagy kezdeti tüzelési frekvenciával rendelkeztek, szinte egyáltalán nem változtatta meg az ACEA **(19. ábra, A)**. Ezzel összhangban, az alacsony frekvenciájú kalciumhullámokat produkáló sejtek jelentősebb kalciumhullám-frekvencianövekedést produkáltak ACEA hatására **(19. ábra, B)**. A jelenség egy lehetséges magyarázata az, hogy az aktívabb neuronok és asztrociták egy tónusos endokannabinoid hatásnak köszönhetik fokozott aktivitásukat. Ezt a feltevést úgy ellenőriztük, hogy a szeleteket alacsonyabb koncentrációjú ACEA-t tartalmazó oldatban (50 nmol/l) 5-7 percig előinkubáltuk, majd nagyobb koncentrációjú (5  $\mu$ mol/l) ACEA került alkalmazásra. Előinkubált mintákon a neuronális membránpotenciál-változások szignifikánsan csökkentek az előinkubáció nélküli esetekhez képest (n=15; **19. ábra, C-E**). Ehhez hasonlóan, az előinkubáció hatására aktívabb, nagyobb frekvenciájú kalciumhullámokat produkáló asztrociták a magasabb koncentrációjú ACEA alkalmazására egyáltalán nem növelték meg a kalciumhullám-frekvenciát.



19. ábra. A jelmagyarázatot l. a túloldalon.

**19. ábra. A fokozott kannabinoid tónus meggátolja a neuronális membránpotenciál-változásokat és az asztrociták kalciumhullámainak frekvencianövekedését.** **A.** A neuronok kontroll körülmények között megfigyelt tüzelési frekvenciája (n=46) fordítottan arányos az ACEA által kiváltott membránpotenciál változással (S=-0,8046, p=0,019). **B.** Az asztrociták kalciumhullámainak frekvenciaváltozása is fordítottan arányos a kiindulási frekvenciával (S=-0,8545, P=0,0015). **C.** Egy, az alacsony koncentrációjú ACEA (50 nmol/l) hatására aktiválódott neuron (felső görbe) és a környező nagy bazális aktivitást mutató asztrociták (3 lentebbi görbe) nem mutatnak szignifikáns változást 5  $\mu$ mol/l ACEA hatására. **D.** Átlagos neuronális membránpotenciál változások (felső görbe) és az asztrociták kalciumhullám-frekvenciájának változásai (alsó görbe). Minden egyes adatpont átlagosan a 30 s alatt mért összes adatpont átlagát mutatják. Az 50 nM ACEA-val előinkubált asztrociták kalciumhullám-frekvenciája szignifikánsan magasabb volt (0,62 $\pm$ 0,08/perc; p=0,0001; n=120), mint az ACEA-ra depolarizáló (b), vagy hiperpolarizáló (c) neuronok szomszédságában elhelyezkedő asztrociták esetében, de lényegesen kisebb, mint azon asztrociták kalciumhullám-frekvenciája, melyek az ACEA-ra nem reagáló neuronok szomszédságában helyezkednek el (**a**) (n=48, p=0,0001). 5  $\mu$ mol/l ACEA alkalmazása nem váltott ki jelentős kalciumhullám-frekvenciaváltozást (0,66 $\pm$ 0,1/perc). **E.** 5  $\mu$ mol/l ACEA hatására bekövetkező neuronális membránpotenciál- ( $\Delta$ RMP) és tüzelési frekvencia ( $\Delta$ Freq.) változások ACEA-előinkubáció nélkül (fekete pontok) és 50 nM-os ACEA-val történő előinkubálást követően (piros pontok). Az alacsony dózisú ACEA-val történő előinkubálás jelentősen csökkentette, de nem szüntette meg a neuronális válaszokat (p = 0,021; n = 15).

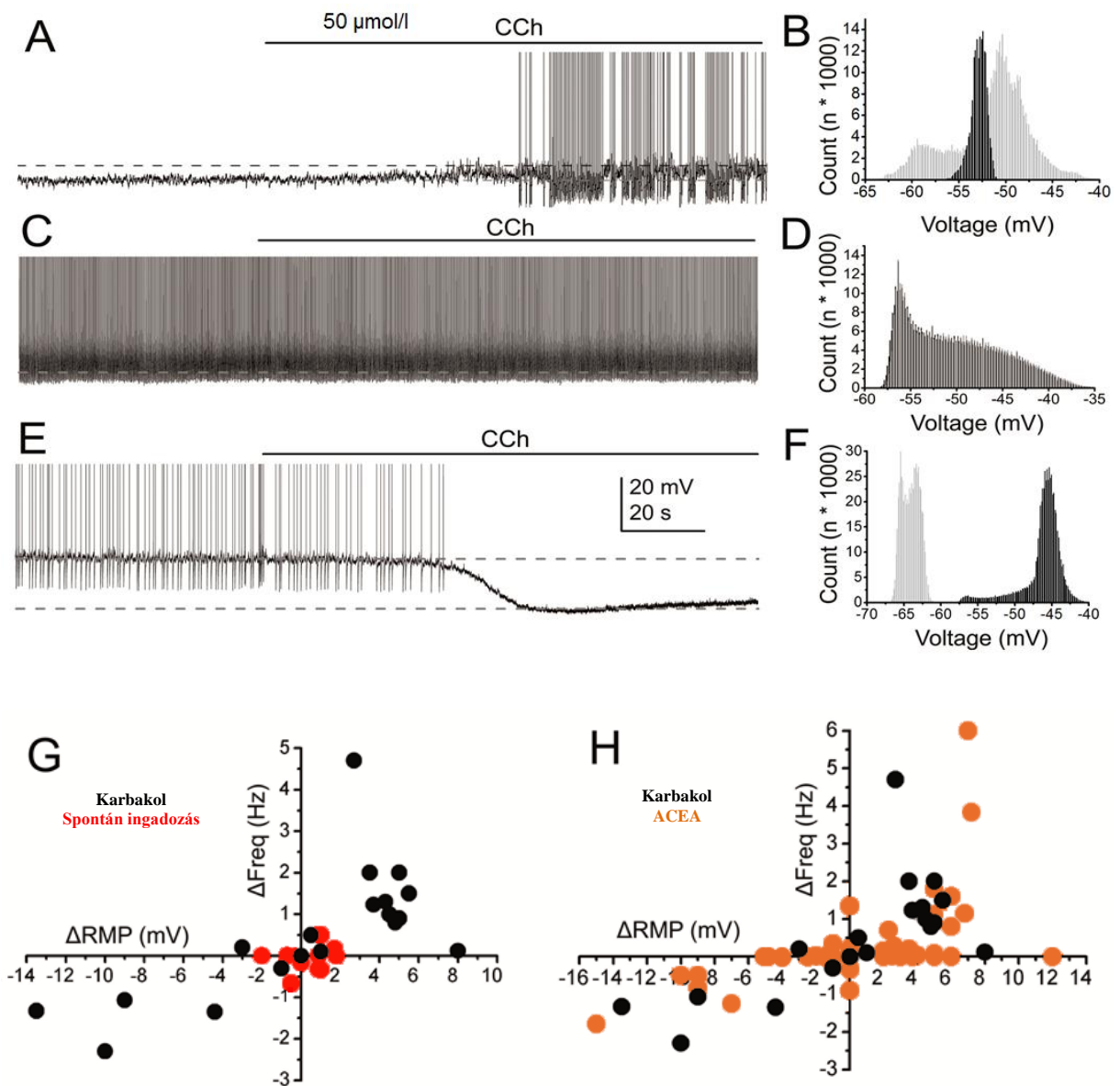
A következő kísérletben azt vizsgáltuk meg, hogy a neuronok depolarizációja képes-e CB1 receptoron keresztül aktiválni a környező asztrocitákat, hasonlóan az általunk korábban alkalmazott exogén kannabinoidok hatásához. Ennek vizsgálatához egy 10 mV-os depolarizációt kialakító áramlépcsőt alkalmaztunk a vad típusú állatokból származó szeletek neuronjain (n=3), és azt tapasztaltuk, hogy a szóma 50  $\mu$ m-es környezetében található asztrocitákban mintegy megkétszereződött a kalciumhullámok frekvenciája (**20. ábra, A-C**). A CB1 receptor knockout állatokból származó méréseknél (n=4), ez a kalciumhullám-változás szignifikánsan kisebb volt (**20. ábra, D-F**). Az, hogy a CB1 knockout egerekben szignifikánsan kisebb mértékben ugyan, de láttunk  $\text{Ca}^{2+}$  hullám frekvencianövekedést, annak tulajdonítható, hogy a neuronok depolarizációja és akcióspotenciál-tüzelése során felszabaduló neurotranszmitterek és az asztrociták neurotranszmitter-receptorának aktivációja is fokozhatja az asztrociták kalciumhullámainak frekvenciáját a CB1 knockout egérben. Mindezek mellett annak a lehetősége sem zárható ki teljesen, hogy az endogén kannabinoidok nem csak CB1 receptorokat, hanem más egyéb receptorokat is aktiválnak a mi preparátumunkban is, mint például CB2, GPR55 vagy TRPV1 receptor.



20. ábra. A küszöb feletti (10 mV-os) neuronális depolarizáció által a szomszédos asztrocitákban CB1 receptor-függő úton váltható ki kalciumhullám-frekvencianövekedés. **A**: Egy vad típusú egérből származó PPN szeletben mért neuron (csillag) és OGB-vel töltött asztrociták képe. **B**; **C**. A csillaggal jelölt neuron áraminjekcióval kiváltott 10 mV-os depolarizációjának hatására kialakuló akcióspotenciál-tüzelés (felső görbe) és az intracelluláris kalciumkoncentráció-változások átlagai a hét szomszédos asztrocitában (alsó görbe). A vízszintes szaggatott vonalak a depolarizáló áraminjekció időtartamát jelzik. **D**. Az asztrociták kalciumhullám-frekvenciájának időbeli változásai. Minden adatpont 30 s átlagának felel meg. A frekvencia szignifikánsan megemelkedik a neuronális depolarizáció alatt ( $p=0,004$ ). **E-H**. Ugyanez a depolarizáció egy CB1 knock-out állatból származó neuronon csak kisebb mértékű kalciumhullám-frekvenciaemelkedést váltott ki a szomszédos asztrocitákból ( $p=0,058$ ).

## 5. A kolinerg és endokannabinoid hatások átfednek a PPN neuronjain

Kísérleteink további részében arra a kérdésre kerestünk választ, hogy a kolinerg neuromoduláció hatásai mennyire fednek át a korábban megfigyelt kannabinoid hatással. Irodalmi adatokból ismert, hogy a muszkarinos acetilkolin-receptor agonista karbakol a PPN neuronjainak egy részét depolarizálta, más részét hiperpolarizálta, míg egy kisebb hányadukra nem hatott (Ye és mtsai., 2010). Az irodalmi adatok alapján ismert hatást nekünk is sikerült reprodukálni. 22 PPN neuronon végeztünk méréseket patch-clamp technika teljes-sejtes elrendezésében, áram-clamp üzemmódban. A neuronok többsége (22-ből 19) spontánul tüzelt, átlagosan  $3,4 \pm 0,6$  Hz frekvenciával. A sejtek  $50 \mu\text{mol/l}$  karbakolra különböző módon válaszoltak: 10 (45%) depolarizálódott és megnőtt az akciós potenciál tüzelési frekvencia gyakorisága, 7 (32%) hiperpolarizálódott és csökkent vagy teljesen megszűnt a spontán aktivitásuk. A többi sejt (5 db; 23%) nem válaszolt karbakolra (21. ábra, A-F). E változások nagysága szignifikánsan meghaladta a spontán változások nagyságát ( $p=0,0005$  a nyugalmi membránpotenciál,  $p=0,0064$  a tüzelési frekvencia esetén; Fisher-teszt; 21. ábra, G). A neuronok helyét és morfológiáját biocitin-jelöléssel és utólagos kolin-acetiltranszferáz immunjelöléssel végeztük. Mind a kolinerg, mind pedig a nem-kolinerg neuronok esetében, karbakol hatására heterogén választ figyeltünk meg, ami depolarizációból, válaszhiányból és hiperpolarizációból állt. A heterogén válasz karbakol hatására nem tér el lényegesen a korábbi méréseinkben alkalmazott ACEA hatásától ( $p=0,885$  a nyugalmi membránpotenciál és a  $p=0,11$  a tüzelési frekvencia esetén; Fisher-teszt; 21. ábra, H). Az átlagos depolarizáció karbakol hatására  $4,7 \pm 0,45$  mV-nak bizonyult, mely együtt járt  $1,55 \pm 0,39$  Hz nagyságú tüzelési frekvencianövekedéssel. Az átlagos hiperpolarizáció  $-6,58 \pm 1,2$  mV, a tüzelési frekvencia csökkenése pedig  $-2,8 \pm 1,14$  Hz volt.

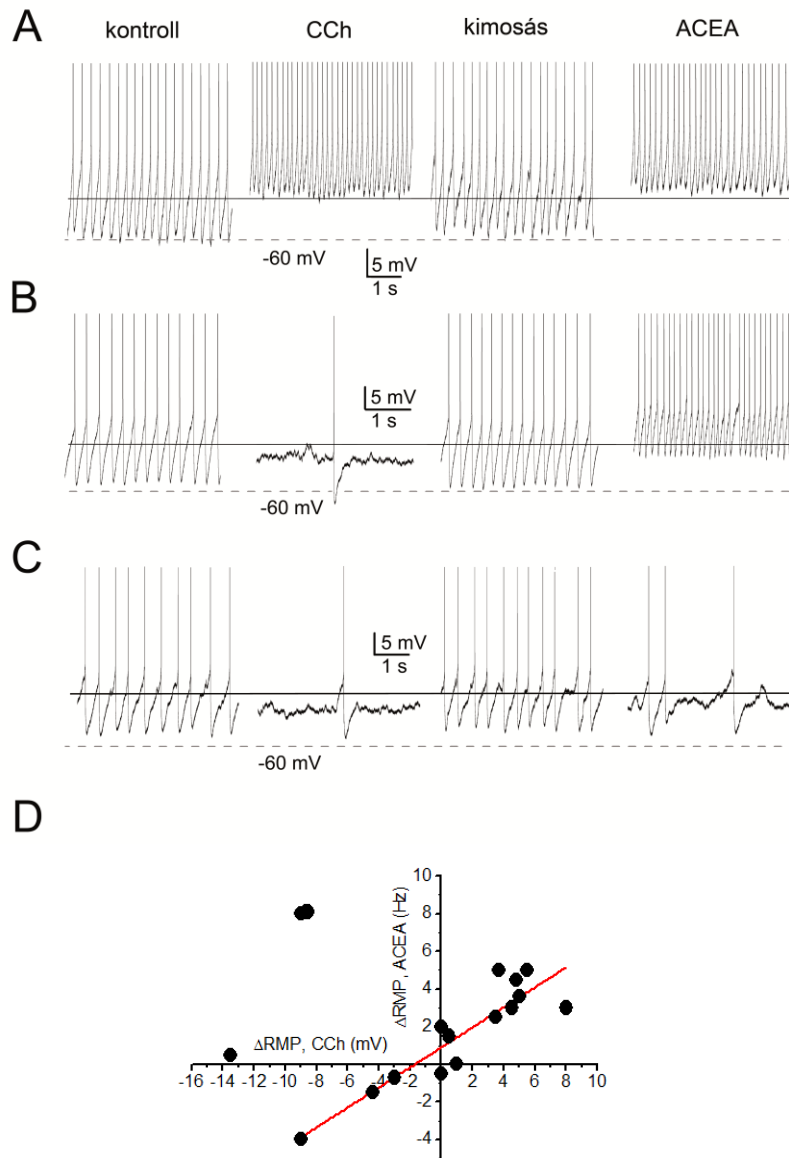


21. ábra. 50  $\mu\text{M}$  karbakol hatása a PPN neuronjainak membránpotenciáljára és akciós potenciál tüzelésére. **A.** Reprezentatív membránpotenciál-mérés egy olyan neuronról, ahol a karbakol depolarizációt és a tüzelési frekvencia növekedést eredményezett. **B.** Az A panelen látható méréshez tartozó hisztogramok, a kontroll körülmények között végzett (fekete) és karbakol alkalmazása alatt felvett szakaszokról (szürke). A hisztogramon levő legmagasabb csúcsot tekintettük a nyugalmi membránpotenciálnak. **C, D.** Reprezentatív membránpotenciál-mérés és hisztogram egy olyan neuronról, ahol a karbakol nem okozott változást a membránpotenciálban és a tüzelési frekvenciában. **E, F.** Reprezentatív membránpotenciál-mérés egy olyan neuronról, ahol a karbakol hiperpolarizációt és a spontán aktivitás megszűnését eredményezte. **G.** A karbakol (fekete pontok) által okozott membránpotenciál- és tüzelésifrekvencia-változások összehasonlítása a szerek bemosása nélkül mért spontán ingadozásokkal (piros pontok). Az x tengelyen a membránpotenciál ( $\Delta\text{RMP}$ ), az y tengelyen az akcióspotenciál-tüzelés változásait ( $\Delta\text{Freq}$ ) tüntettük fel. **H.** A karbakol (fekete) és az ACEA (narancssárga) által okozott membránpotenciál- és tüzelésifrekvencia-változások összehasonlítása két külön neuronális populáción.

A következőkben azt vizsgáltuk, hogy a kolinerg és kannabinoid stimulációra adott válaszok ugyanazon neuronon megegyeznek-e, vagy az individuális neuronok különbözően reagálnak-e az egyes szerekre. Ennek meghatározásához, teljes-sejtes patch-clamp kísérletet végeztünk áram-clamp üzemmódban 16 PPN neuronon, ahol először a karbakolt alkalmaztuk, majd miután megfelelően kimostuk a karbakolt, 5  $\mu\text{mol/l}$   $\text{CB}_1$  receptor agonista ACEA-t mostunk be. A karbakol hatása általában 2-4 perc alatt volt teljesen kimosható, de a biztos kimosás érdekében 5 percig tartó (1ml/perc), normál aCSF-et tartalmazó oldattal történő perfundálást végeztünk. Mivel az ACEA hatása nem, vagy csak részlegesen mosható ki, ezért alkalmaztuk elsőként a jól kimosható karbakolt, majd utána az ACEA-t (**Himpens és mtsai., 1991; Park és mtsai., 2004**).

Hét esetben a karbakol depolarizációt váltott ki. Ezekben a neuronokon az ACEA alkalmazása ugyancsak depolarizációt váltott ki ( $5\pm 0,6$  mV karbakolra és  $3,8\pm 0,38$  mV ACEA-ra). Nem volt szignifikáns különbség a két szer által kiváltott depolarizáció nagyságában ( $p=0,053$ ). Négy esetben a karbakol nem okozott semmilyen változást; ezeken a sejteken az ACEA alkalmazása sem eredményezett változást. Öt neuronon hiperpolarizációt váltott ki a karbakol. Ezekben a sejteken az ACEA alkalmazása nem mutatott olyan szoros összefüggést a karbakol hatásával, mint az előző esetekben: az 5 neuronból egy esetben depolarizációt, egy esetben válaszhiányt, és 3 sejten hiperpolarizációt tapasztaltunk ACEA hatására (átlagosan  $-7,7\pm 1,9$  mV karbakol hatására,  $0,48\pm 2,1$  mV ACEA hatására). A szerek hatása közötti különbség szignifikáns volt ebben a populációban ( $p=0,009$ ) (**22. ábra, A-C**). A két hatás összehasonlítása érdekében az ugyanazon sejtpopuláción karbakol hatására kialakuló membránpotenciál-változást az ACEA-ra kialakuló membránpotenciál-változás függvényében tüntettük fel. Feltételeztük, hogy a lineáris illesztést lehet a legjobban alkalmazni a két alkalmazott szer által kiváltott hatás egyezésének vagy különbözőségének összevetésére. Amikor az összes adatpontra egyenest illesztettük, az illesztés korrektségét jelző  $R^2$  értékre 0,086-ot kaptunk. Azonban amikor azokat az értékeket eltávolítottuk az adatsorból, ahol a karbakol hiperpolarizációt okozott, az ACEA pedig depolarizációt vagy egyáltalán nem váltott ki választ, az  $R^2$  értéke jelentősen nőtt (0,801) (**22. ábra, D**). Ez azt jelzi, hogy azokban az esetekben eltérés figyelhető meg a karbakol és az ACEA hatása között, amikor az előbbi szer hiperpolarizációt okozott. A tüzelési frekvencia változása is hasonló tendenciát mutatott. Azon sejtek, amelyek tüzelésifrekvencia-növekedést mutattak, hasonlóan reagáltak karbakolra és ACEA-ra ( $1,24\pm 0,26$  Hz változás karbakolra,  $0,91\pm 0,4$  Hz változás ACEA-ra) egyaránt. Azon sejtek, melyek csökkentették a tüzelési frekvenciát karbakol hatására, eltérő módon reagáltak ACEA-ra ( $-2,17\pm 1,3$  Hz változás karbakolra, és  $-0,066\pm 0,6$

H<sub>z</sub> változás ACEA-ra; **22. ábra, A-D, 1. táblázat**). Mikor a tüzelési frekvencia változások adatpontjait ugyanolyan lineáris illesztéssel határoztuk meg, mint a nyugalmi membránpotenciál változás értékét, az R<sup>2</sup> értéke -0,07 volt, míg ha ugyanazon neuronok adatait távolítottuk el az értékelésből, mint az előző számítás esetén, az R<sup>2</sup> értéke 0.416-ra nőtt.



**22. ábra. A karkakol és az ACEA egymás utáni alkalmazásának hatása ugyanazokon a neuronokon.** **A.** Egy neuronról elvezetett reprezentatív membránpotenciál-görbék, ahol a karkakol ugyanolyan depolarizációt és tüzelésfrekvencia-emelkedést váltott ki, mint az ACEA. **B.** Egy másik neuronról felvett görbék, amely hiperpolarizálódott karkakol hatására és depolarizálódott ACEA hatására. **C.** Egy harmadik neuronról származó mérési eredmények, amely hiperpolarizálódott mindkét agonista hatására (szaggatott vonalak: -60 mV; folyamatos vonalak: számított nyugalmi membránpotenciál) **D.** A karkakol és az azt követő ACEA alkalmazásának hatására kialakuló nyugalmi membránpotenciál változások statisztikai összehasonlítása. ACEA: arachidonyl-2-chloroethylamide; CCh: karkakol; RMP: nyugalmi membrán potenciál.

Paraméterek	Depolarizált sejt (n = 7)	Hiperpolarizált sejt (n = 5)	Nem válaszoló sejt (n = 4)
Nyugalmi membránpotenciál változás (RMP) karbakol hatására (mV)	5 ± 0.6	-7.7 ± 1.9	0.4 ± 0.2
RMP változás ACEA hatására (mV)	3.8 ± 0.4	0.5 ± 2.1	0.75 ± 0.6
Tüzelési frekvencia változás karbakol hatására (Hz)	1.2 ± 0.3	-2.2 ± 1.3	0.15 ± 0.1
Tüzelési frekvencia változás ACEA hatására (Hz)	0.9 ± 0.4	-0.1 ± 0.6	-0.15 ± 0.5

*1. táblázat. A karbakol és ACEA hatásainak összehasonlítása.* A változást a kontroll körülmények között történt mérésekhez viszonyítottuk.

## Megbeszélés

A jelen munkában megmutattuk, hogy a nucleus pedunculopontinus neuronjai többféleképpen reagáltak CB1 receptor agonistákra: egyesek depolarizálódtak, mások hiperpolarizálódtak, míg a neuronok egy kisebb része nem reagált. A megfigyelt változások csak kismértékben függtek a neurontípustól, és a neuronális hálózatokra gyakorolt hatás feltehetően nem játszott jelentős szerepet az általunk megfigyelt membránpotenciál-változásokban. A PPN asztrocitáinak aktivációja a neuronokon megfigyelt változások előtt kezdődött el; az asztrociták aktivitásának és a metabotróp glutamát-receptorok gátlása megakadályozta a PPN neuronokon kialakuló kannabinoid hatásokat. A nem reagáló neuronok és asztrociták tónusos endokannabinoid hatás alatt állhatnak; a depolarizált neuronok a környezetükben levő asztrocitákat zömmel CB1 receptoron keresztül aktiválták.

A kannabinoidok neuronális hatásai jelentős, de nem teljes átfedést mutattak a muszkarinos kolinerg neuromoduláció hatásaival a PPN neuronjain: ugyanazon neuronok depolarizálódtak vagy nem reagáltak ACEA és karbakol alkalmazására, viszont a karbakolra hiperpolarizálódó neuronok depolarizálódtak, hiperpolarizálódtak vagy nem reagáltak ACEA alkalmazására.

### 1. Az asztrociták CB1 receptorának aktivációja modulálja a PPN neuronjainak tevékenységét

Széles körben elfogadott az a tény, hogy az asztrociták hatékonyan képesek befolyásolni a neuronális funkciókat (Id. Perea és mtsai., 2009; Frank 2013). Számos neurotranszmitter-receptorral rendelkeznek, amelyeket aktiválva nagyszámú gliotranszmittert szabadíthatnak fel, mint a glutamát, ATP, adenozin, TNF $\alpha$ , D-szerin és peptidek (Volterra és Bezzi, 2002). Az asztrociták jelentősen hozzájárulnak az alvás homeosztázisához (Id. Frank, 2013) az interleukin-1 (IL-1), TNF $\alpha$ , neurotrofinok és prosztaglandinok felszabadításán keresztül. Az egyik legalaposabban vizsgált gliotranszmitter a glutamát, amely az asztrocitákból többféle módon szabadulhat fel: a kalciumfüggő exocitózis mellett (Parpura és mtsai., 1994; Bezzi és mtsai., 2004) a plazmamembrán glutamát transzporterek reverz működésén keresztül (Szatkowski és mtsai., 1990), de cisztein-glutamát antiporttal (Warr és mtsai., 1999), connexin/pannexin "hemichannel"-eken (Cotrina és mtsai., 1998; Ye és mtsai., 2003), ionotróp purinerg receptorokon keresztül (Duan és mtsai., 2003), szerves anion transzportereken (Rosenberg és mtsai., 1994) és sejtduzzadás által nyitott

anioncsatornákon keresztül történő glutamátfelszabadulásról is beszámoltak (**Pasantes Morales és Schousboe, 1988**).

Számos tanulmány kimutatta, hogy mind asztrocita sejt kultúrában (**Molina-Holgado és mtsai., 2003; Id. Stella 2004; Walter és Stella, 2003**), mind pedig az agy bizonyos területein, mint a nucleus accumbens, cinguláris kéreg, mediális előági köteg, amygdala, a gerincvelő és a hippocampus (**Rodriguez és mtsai., 2001; Moldrich és Wenger, 2000; Salio és mtsai., 2002; Navarrete és Araque, 2008; Hegyi és mtsai., 2009**), az asztrociták rendelkeznek CB1 receptorral, melyek kannabinoidok által aktiválva képesek azokon kalciumhullámokat kelteni (**Navarrete és Araque, 2008**). A CB1 receptorok mellett a funkcionális CB2 receptorok ugyancsak kimutathatóak az asztrocitákon (**pl. Fernández-Ruiz és mtsai., 2008**), de e receptor jelentősége az általunk megfigyelt hatásokban nem valószínű. Ennek két oka lehet: az egyik, hogy az ACEA szelektív CB1 receptor agonista (**Hillard és mtsai., 1999**), valamint hogy az ACEA és a WIN55,212-2 hatása szinte teljesen hiányzik a CB1 receptor knockout egerekből.

Az asztrociták kannabinoid jelátvitelben betöltött szerepét részletesen tanulmányozták a hippocampus és a cortex területén (**Navarrete és Araque 2008, 2010; Min és Nevian, 2012; Han és mtsai., 2012; Id. Castillo és mtsai., 2012**). Ezekben a régiókban a neuronok aktivitásának fokozódása endokannabinoid felszabaduláshoz vezet, amely aktiválja az asztrocitákat. Az asztrocita-aktiváció glutamátfelszabadulást okoz, ami potenciózhatja a glutamaterg szinapszisokat vagy hosszú távú depressziót indukálhat NMDA receptorokon vagy a preszinaptikus mGluR-okon keresztül. A jelen munkában megmutattuk, hogy alapjaiban hasonló, bár nem teljesen azonos mechanizmus jelen van szubkortikálisan is, a RAS egy magjában is. Kimutattuk továbbá, hogy - hasonlóan, a kérgi struktúrákhoz (**Navarrete és Araque, 2008, 2010; Id. Castillo és mtsai., 2012**) - a neuronok depolarizációja az asztrociták zömmel CB1 receptoron keresztüli aktiválásához vezet. Az aktivált asztrociták feltehetően vagy felszabadítanak glutamátot, vagy mérséklék glutamátfelvevő tevékenységüket, így feltehetően szabályozzák a glutamát mennyiségét. Ez a glutamát metabotróp glutamát receptorokon keresztül fejti ki az általunk megfigyelt neuronális hatást. Érdekes módon azonban a neuronok tónusos stimulációjában vagy gátlásában a szinaptikus aktivitás közvetlen, preszinaptikus CB1 receptoron keresztüli gátlása vagy a preszinaptikus mGluR-okon keresztüli aktiválása nem játszott fontos szerepet, mert a gyors szinaptikus neurotranszmisszió gátlása nem befolyásolta a tónusos neuronális kannabinoid

hatásokat. Mindezek látszólagos ellentmondásban vannak azzal a régóta elfogadott és szélesen bizonyított ténnyel, hogy a kannabinoid hatások nagy része preszinaptikus CB1 receptoron keresztül, a szinaptikus neurotranszmisszió gátlása révén valósul meg (**Id. Lovinger, 2008; Diana és Marty, 2004; Katona és Freund, 2012**). Mindezen ellentmondások feloldása egyrészt későbbi kutatási feladat, másrészt figyelembe kell venni a kísérleti modell nyújtotta korlátokat: a vékonyszelet-preparátumon végzett mérések során a PPN-t megfosztjuk fontos kapcsolataitól, így a kísérleteink során nem a teljes kannabinoid hatást, hanem csak annak lokális részét figyelhettük meg.

## 2. Az mGluR-ok szerepe a neuron-glia jelátvitelben

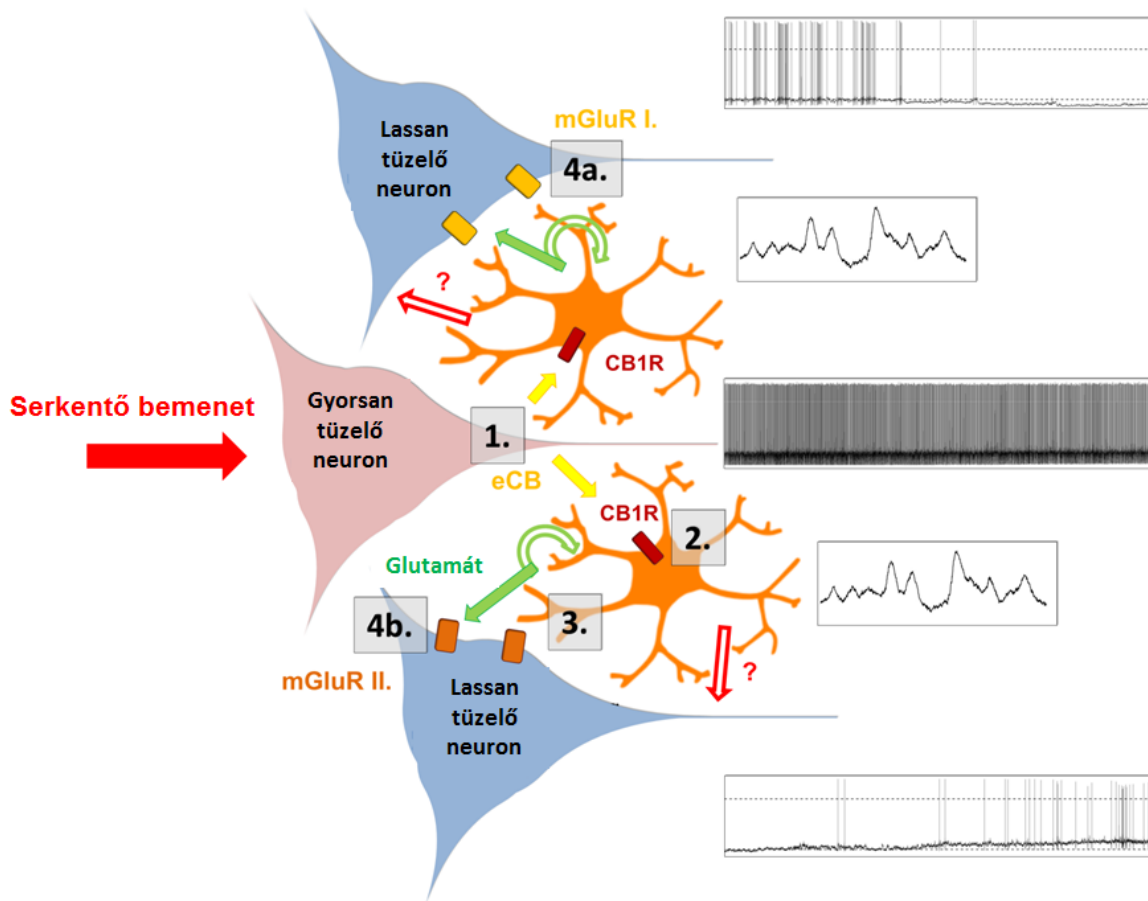
A kísérleteink során használt mGluR I és mGluR II gátlószerek alkalmazásával megmutattuk, hogy a neuronális hiperpolarizáció mGluR I aktivációján keresztül megy végbe, míg a depolarizáció mGluR II függő. Újabb tanulmányok demonstrálták az I-es és II-es típusú mGluR-ok funkcióját és jelenlétét középgygi régiókban (**Wilson-Poe és mtsai., 2013; Kohlmeier és mtsai., 2013**), valamint hogy az asztrociták aktivációja preszinaptikus mGluR-ok aktivációjához vezet, és szerepük van a hosszú távú potencírozás folyamatában a hippocampus területén (**Navarrete és mtsai., 2012**). Kísérleteink során nem vizsgáltuk ezen csatornák identitását. Mindezek mellett, tudomásom szerint a jelen munka az első arra vonatkozó bizonyíték, hogy mGluR típustól függően tónusos neuronális aktiváció vagy gátlás megy végbe egy középgygi területen.

Az mGluR-ok széles körben megtalálhatóak a központi idegrendszer területén mind pre-, mind posztszinaptikus lokalizációban (**Id. Ferraguti és Shigemoto, 2006; Niswender és Conn, 2010**). Számos tanulmány leírta az I-es és II-es csoportba tartozó mGluR-ok jelenlétét asztrocitákon (**Petralia és mtsai., 1996; Schools és Kimelberg, 1999; Zur Nieden és Deitmer, 2006; D'Ascenzo és mtsai., 2007; Pirttimaki és Parri, 2012; Id. Ferraguti és Shigemoto, 2006; Schoepp, 2001; Id. D'Antoni és mtsai., 2008**), melyek képesek az extracelluláris glutamát koncentráció változásaira reagálni (**Zur Nieden és Deitmer, 2006**). A glutamát és az mGluR I és II agonisták a hippocampális asztrocitákon kalciumhullámokat keltenek, amelyek "glutamát-indukált glutamát felszabadulást" váltanak ki (**Bezzi és mtsai., 2004; Zur Nieden és Deitmer, 2006; Pirttimaki és mtsai., 2011; D'Ascenzo és mtsai., 2007**). Más eredmények szerint azonban mGluR I és II antagonisták nem változtatták meg a hippocampális asztrociták kalciumjeleit (**Nett és mtsai., 2002**).

Számos megfigyelés igazolta, hogy a posztszinaptikus mGluR I és II aktiváció neuronális membránpotenciál-változásokhoz vezetett. Több tanulmány szerint a posztszinaptikus mGluR I aktivációja depolarizációt, míg az mGluR II aktivációja hiperpolarizációt okoz (Id. Sherman, 2014). Az mGluR I aktiváció során neuronokban végbemenő depolarizáció (Libri és mtsai., 1997; Partridge és mtsai., 2014) egyrészt L-típusú kalciumcsatornákon keresztül valósul meg a hippocampus CA1 piramissejteken (Kato és mtsai., 2012) és a gyrus cinguliban (Zhang és Séguéla 2010), másrészt nem-szelektív kationcsatornákon keresztül megy végbe a bulbus olfactorius szemcsesejtjeiben (Smith és mtsai., 2009). Az mGluR II aktivációja vagy az L-típusú kalciumcsatornák gátlásán (Chavis és mtsai., 1994, 1995), vagy a káliumcsatornák aktivációján keresztül fejt ki hatását (Knoflach és Kemp, 1998; Irie és mtsai., 2006; Hermes és Renaud, 2011), ezzel hiperpolarizálva az ezeket a receptorokat expresszáló neuronokat. Az ezzel ellentétes hatások is ismertek. Kérgi és szubkortikális struktúrákban (hippocampus, amygdala, bulbus olfactorius, pallidum, nucleus laterodorsalis tegmentalis) a posztszinaptikus mGluR5 stimulációja (ami egy mGluR I-be tartozó receptor) a  $K^+$  csatornák aktivációjához vezet (Jian és mtsai., 2010; Mannaioni és mtsai., 2001; Poisik és mtsai., 2003; Rainnie és mtsai., 1994; Harata és mtsai., 1996; Kohlmeier és mtsai., 2013), ezzel hiperpolarizálva az ezeket a receptorokat expresszáló neuronokat. A szomatodendritikus lokalizációjú mGluR II aktivációja posztszinaptikus serkentő választ vált ki a hippocampus CA3 piramissejtjeiben, kationcsatornák aktiválásával és a  $K^+$  csatornák gátlásával (Ster és mtsai., 2011).

Megfigyeléseink alapján az mGluR I antagonisták kivédték az ACEA által kiváltott hiperpolarizációt és az mGluR II blokkolók gátolták a depolarizáció létrejöttét. Az ionotróp glutamátreceptor-blokkolók nem védték ki az ACEA nyugalmi membránpotenciálra gyakorolt hatását, míg a glutamát képes volt neuronális depolarizációt kiváltani thapsigargin jelenlétében. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a CB1 receptoron keresztül megvalósuló asztrocita-aktiválás glutamátfelszabadulás révén különböző metabotróp glutamát receptorokon keresztül váltja ki a neuronális válaszokat.

Az eredményeink alapján felállítható legegyszerűbb modellben a neuronokból felszabaduló endokannabinoidok az asztrocitákat CB1 receptoron keresztül aktiválják. Az asztrocitákból glutamát szabadul fel, amely depolarizálja vagy hiperpolarizálja a környező neuronokat aszerint, hogy rajtuk milyen metabotróp glutamátreceptorok találhatóak (23. ábra).



23. ábra. A PPN-ben endokannabinoid jelátvitel áttekintő modellje. 1. Az aktív PPN neuronok endokannabinoidokat (eCB) szabadítanak fel. 2. A felszabaduló endokannabinoidok aktiválják az asztrociták CB1 receptorait. 3. Az asztrocitákban ennek hatására megnövekszik a kalciumhullámok frekvenciája, ami gliotranszmitter-felszabaduláshoz vezet. A gliotranszmitterként felszabaduló (vagy felvételre nem kerülő) glutamát a szomszédos neuronokon levő mGluR I aktiválása útján hiperpolarizációt (4a), vagy mGluR II-n keresztül depolarizációt vált ki (4b). A glutamát mindezek mellett aktiválhatja az asztrociták glutamát receptorait is (üres piros nyilak). Ezek az asztrocitákon levő mGluR-ok más, általunk nem vizsgált gliotranszmitterek felszabadulásához vagy annak gátlásához vezethetnek, így hozzájárulva a megfigyelt hatáshoz (piros kérdőjelek; részleteket lásd a "Megbeszélés" fejezetben).

Ugyanakkor a fent leírt modell túlságosan leegyszerűsítheti a helyzetet, hiszen az asztrociták közismerten expresszálnak különböző mGluR-okat (Zur Nieden és Deitmer, 2006), és az egyes mGluR-ok jelenléte vagy hiánya felelős lehet az asztrociták funkcionális különbségeiért (Parri és mtsai., 2010).

Az ACEA-ra adott asztrocita-válasz nagysága és időbeli lefutása eltérőnek bizonyult a depolarizált és hiperpolarizált neuronok közelében (16. ábra. F, H). Ez arra utalhat, hogy egyes asztrocitákban különböző mGluR-ok fordulhatnak elő, amelyek a glutamát elhúzódo felszabadulását és a "glutamát által kiváltott glutamát felszabadulás" jelenségét (D'Ascenzo és

**mtsai., 2007)**, a tónusos glutamátfelszabadulás csökkenését vagy növekedését (**Xi és mtsai., 2002; Zur Nieden és Deitmer 2006**) vagy a glutamáttal együtt felszabaduló egyéb gliotranszmitterek felszabadulását idézhetik elő (**Shibasaki és mtsai., 2014**).

Azt is kimutattuk, hogy a megemelkedett endokannabinoid tónus csökkentheti, vagy teljesen meg is szüntetheti az ACEA-ra kialakuló választ mind a neuronokban, mind pedig az asztrocitákban. Ugyanakkor nemcsak az endokannabinoid tónus, hanem más aktivitásfüggő és sejttípus-specifikus mechanizmusok is szerephez juthatnak a CB1 receptor stimuláció során tapasztalt válaszhiányban, mivel az alacsony dózisu ACEA-val történő előinkubáció nem teljesen modellezte a sejtek kontroll körülmények közötti aktivitását és a válasz teljes hiányát, amelyet a nem válaszoló sejtek esetében megfigyelhettünk. A CB1 receptor stimuláció során tapasztalt válaszhiány az aktív neuronok környezetében az endokannabinoidok mellett aktivitásfüggő módon felszabaduló egyéb anyagok (neurotranszmitterek, neuropeptidek) hatására is bekövetkezhet. Egyes neuronok esetleg rendelkezhetnek olyan receptorokkal, amelyek ezeket a molekulákat érzékelik, mások nem; így az előbbieket stimulálja a felszabaduló anyag és okkluzív hatást fejt ki az általunk alkalmazott CB1 receptor agonistára, míg másoknak nincs ilyen receptora, és ezekre hat a CB1 receptor agonista.

### **3. A kolinerg és kannabinoid agonisták hatásainak átfedése a PPN neuronjain**

Kísérleteink során azt láttuk, hogy a PPN neuronjai karbakolra (muszkarinos acetilkolin receptor agonista) és ACEA-ra (CB1 receptor agonista) hasonló módon reagálnak. Korábbi irodalmi adatokból ismert, hogy a kolinerg és kannabinoid hatások hasonlóan átfednek, mint az előzőleg leírt szerotoninerger és kolinerg neuromodulációk egyezései (**Leonard és mtsai., 1994**), vagy pedig az orexin és ghrelin egymással átfedő hatásai (**Kim és mtsai., 2009**); jelezve, hogy közös neuromodulációs útvonalak lehetnek a PPN-ben. Az általunk megfigyelt és mások által is leírt, a neuromodulációs rendszerek között megfigyelt átfedéseknek számos oka lehet.

#### **3. 1. A neuronális depolarizáció lehetséges okai**

A karbakol hatásához hasonlóan, a PPN neuronjainak válasza ACEA-ra depolarizáció és tüzelési frekvencia emelkedés, hiperpolarizáció és tüzelési frekvencia csökkenés, vagy válaszhiány. Ezeken a sejteken a karbakol depolarizációt váltott ki, az ACEA pedig

ugyancsak depolarizációt okozott. Kimutatták, hogy a karbakol posztszinaptikus serkentő hatásait az M1 és nACh receptor stimulációja közvetíti a PPN thalamikus projekciós neuronjaiban (Ye és mtsai., 2010). Ismert továbbá, hogy a nACh receptor közvetlenül gátolható endokannabinoidokkal, és közvetetten a CB1 vagy CB2 receptorok aktivációjával (Id. Demuth és Molleman, 2006); így bár nAChR aktiváció elméletileg állhat a karbakol által okozott depolarizáció hátterében, a nAChR CB1 receptor agonista hatására bekövetkező gátlása semmiképpen sem okozhatott volna ugyancsak depolarizációt. Az M1 receptor aktivációja azonban a CB1 receptorhoz hasonló jelátviteli útvonalakat aktiválhat, így ez az átfedés magyarázhatja a hasonló hatást. Hasonló átfedést írtak le a musculus ciliarisban az M3 és a CB1 receptor jelátviteli útvonalaiban, mivel ezek a receptorok ugyanúgy a rho-kináz és a protein-kináz C aktivációján keresztül fejtik ki hatásukat (Romano és Lograno, 2013). Az asztrociták CB1 receptorának aktivációja depolarizálta a PPN neuronokat az asztrocitákból történő glutamátfelszabadulás révén, mely feltehetően a neuronokon levő II-es típusú mGluR-t aktiválja. Az M1 és a mGluR II receptorok aktivációja egy közös jelátviteli útvonalat indíthat el; hasonló konduktanciákat aktiválhatnak vagy gátolhatnak, és ez ugyancsak vezethet ugyanazon neuronok depolarizációjához. Továbbá, Purkinje-sejtekben (Rinaldo és Hansel, 2013) és hippocampusban (Kim és mtsai., 2009) is leírták, hogy a muszkarinos acetilkolin receptorok aktivációja fokozhatja az endokannabinoid szintézist. Ha a PPN esetében is létezik hasonló mechanizmus, az M1 receptor aktivációja megnövelheti a kannabinoid szintézist a neuronokon, amely aztán aktiválja környező asztrocitákat, és így a muszkarinos hatás endokannabinoidok közvetítésével is végbemehet.

### 3. 2. A neuronok válasziányának háttere

Azon neuronok, melyek nem reagáltak karbakolra, nem válaszoltak ACEA-ra sem. Kimutattuk, hogy a nem válaszoló sejtek valószínűleg azért nem reagáltak, mert megnövekedett az endokannabinoid tónus körülöttük. Ennek megfelelően a karbakolra nem reagáló sejtek körül vagy szintén a megemelkedett endokannabinoid tónus okozza a válasziányt, vagy a magas endokannabinoid tónussal egyidejűleg magas acetilkolin-tónus is kialakult körülöttük.

### 3. 3. A neuronális hiperpolarizáció háttere

A karbakol hatására bekövetkező hiperpolarizáció nincs teljes átfedésben az ACEA által kiváltott hiperpolarizációval, mivel a karbakolra hiperpolarizálódott sejtek egyes esetekben depolarizálódtak vagy nem válaszoltak ACEA hatására. Összhangban az M1 mediált endokannabinoid felszabadulás elméletével; feltételezhetjük, hogy a karbakol által indukált hiperpolarizáció M2 vagy M4 receptoron valósul meg, és ezen receptorok aktivációja felülírhatja az M1 receptor függő útvonalon, endokannabinoid-felszabaduláson keresztül megvalósuló heterogén választ. Az is elképzelhető továbbá, hogy a másmilyen muszkarinos receptorokat kifejező neuronok eltérő mGluR-okat expresszálnak, és ez állhat a funkcionális különbségek hátterében.

A muszkarinos és endokannabinoid hatások átfedéseinek további, ugyancsak még vizsgálatra szoruló oka lehet, hogy mindkét hatás legalább részben az asztrociták aktiválódásán keresztül valósul meg. Az asztrociták aktivációján keresztül megvalósuló kolinerg neuromodulációs hatások leírásra kerültek más struktúrákban (**Navarrete és Araque, 2012; Chen és mtsai., 2012**), és a fentiekben vázoltunk egy, az asztrocitákon keresztül megvalósuló, indirekt endokannabinoid hatást. Vonzó lehetőség feltételezni, hogy a PPN-ben több neuromodulációs hatásnak van egy közös "asztrocita-komponense", amit a neuronokon közvetlenül érvényesülő hatások mindössze módosítanak. Ennek a feltevésnek a bizonyítása azonban további kísérleteket igényel.

### 4. A PPN endokannabinoid modulációja és az alvás-ébrenlét szabályozása

A kannabinoid receptor agonistákról ismert, hogy fokozzák mind a REM alvás (**Murillo-Rodríguez és mtsai., 1998, 2001, 2008; Murillo-Rodríguez, 2008; Herrera-Solís és mtsai., 2010**), mind a nem-REM alvás időtartamát (**Herrera-Solís és mtsai., 2010; ld. Bolla és mtsai., 2008**). Bár in vitro adatokat más rendszereken mért in vivo adatokkal korreláltatni spekulatív lehet; elképzelhető, hogy az egyes PPN neuronok CB1 receptoron keresztüli serkentése, valamint mások gátlása hozzájárulhat az alvás időtartamának megnyújtásához (**Feinberg és mtsai., 1975; Murillo-Rodríguez és mtsai., 1998, 2001, 2008; Murillo Rodríguez, 2008; Herrera-Solís és mtsai., 2010**). Megfigyelték, hogy a kérgi lassú hullámú aktivitás alatt a kolinerg sejtek zöme az aktív, míg a nem-kolinerg sejtek inkább a

passzív fázisban aktívak. A kérgi gamma aktivitás megjelenésekor a kolinerg neuronok zöme megnöveli akcióspotenciál-tüzelési frekvenciáját, míg a nem-kolinerg neuronok egy része növeli, más része csökkenti aktivitását, míg egy harmadik populáció nem reagál. Mindezekon túl, a kolinerg neuronok egy kis csoportja a kérgi gamma aktivitástól függetlenül nagy frekvenciával tüzel (**Mena-Segovia és mtsai., 2008; Ros és mtsai., 2010**). Összhangban a fent leírtakkal kimutattuk, hogy hasonló sejtípus-specifikus különbségek vannak a kannabinoid hatásban. A kolinerg neuronok jelentős része (egyharmada) nem reagált a CB1 receptor stimuláció hatására. Ezeknek a neuronoknak viszonylag magas kezdeti tüzelési frekvenciája volt (4-6 Hz), utalva arra, hogy a "gyors-tüzelésű kolinerg" sejtekhez tartoznak (**Mena-Segovia és mtsai., 2008**), amelyek tüzelési frekvenciája nem emelkedik meg az agykérgi gamma aktivitás alatt. Másrészt azonban, a depolarizáció a GABAerg sejtek között nagy arányban volt jelen (70%). Érdekes, hogy az *in vivo* megfigyelések alapján a "csendes" vagy irreguláris tüzelési mintázatot mutató nem-kolinerg neuronok a kérgi gamma oszcillációk alatt fokozták a tüzelési frekvenciájukat, míg a tónusosan tüzelő neuronok nem mutattak változást (**Ros és mtsai., 2010**). Feltehetően az általunk mért GABAerg sejtek nagy része ezekhez a "csendes" vagy irregulárisan tüzelő sejtekhez tartoznak (**Ros és mtsai., 2010**). Az általunk mért egyetlen nem reagáló GABAerg neuron tónusos aktivitást és magas tüzelési frekvenciát mutatott kontroll körülmények között.

A nem-kolinerg neuronok egy, általunk külön nem vizsgált populációja, a glutamaterg sejtcsoport. Azt tapasztaltuk, hogy a nem-kolinerg neuronok ACEA alkalmazásakor megfigyelt reakciói nem különböztek a GABAerg neuronokon megfigyeltektől, így ennek alapján feltételezhetjük, hogy a glutamaterg neuronok is zömmel depolarizációval válaszolnak a CB1 receptor stimulációra.

Az *in vivo* adatok alapján feltételezhetjük, hogy a kérgi deszinkronizációval járó REM alvás (**ld. Pace-Schott, 2009; Steriade és mtsai., 1990**) alatt a legtöbb kolinerg sejtnél és a GABAerg neuronok egy populációjában fokozódik a tüzelési frekvencia, míg más GABAerg neuronok csökkentik a tüzelési frekvenciájukat. Ezzel párhuzamosan, a gyorsan tüzelő kolinerg és a tónusosan tüzelő GABAerg neuronok nem változtatják aktivitásukat (**Mena-Segovia és mtsai., 2008; Ros és mtsai., 2010**). Ezzel szemben a mi eredményeink azt mutatták, hogy a kolinerg neuronoknak csak egyharmada aktiválódott ACEA hatására, míg a másik kétharmada hiperpolarizálódott vagy nem reagált CB1 receptor stimuláció hatására. A

GABAerg neuronok többsége viszont aktiválódott ACEA hatására, és csak egy kisebb populáció hiperpolarizálódott vagy nem reagált.

Ezt az ellentmondást többféleképpen is fel lehet oldani. Egyes tanulmányok szerint **(Murillo-Rodriguez és mtsai., 2001; Herrera-Solís és mtsai., 2010; Id. Bolla és mtsai., 2008)** a kannabinoidok egyaránt fokozzák a REM-alvás és a nem-REM alvás időtartamát; így elképzelhető, hogy a PPN neuronok válaszában aktuális mintázatától függően a kannabinoidok vagy a REM- vagy a nem-REM alvás időtartamát nyújtják meg. Másodszer, közismert, hogy a REM alvás és a nem-REM alvás aránya az alvás teljes időtartama során változik: az életkor előrehaladtával csökken **(Tarokh és Carskadon 2009)**. Patkányokban, körülbelül a 10. napon éri el maximumát, és fokozatos csökkenést mutat egészen a felnőttkor kezdetéig mely körülbelül a 30. napnak felel meg. Ezek a változások összhangban vannak a különböző receptorok (NMDA, kainát, M2, a GABA<sub>A</sub> és B, 5-HT1, stb.) ingerlésére kialakuló membránpotenciál-változások korfüggő eltéréseivel **(Garcia-Rill és mtsai., 2008)**. A CB1 receptor és a metabotróp glutamát receptorok expressziója szintén változik más struktúrákban **(Hubert, 2004; Díaz-Alonso és mtsai., 2014)**. Ennek megfelelően, mivel fiatal egereket használtunk a kísérleteinkhez, az általunk leírt aktivitásmintázat a fiatalkori állapotnak felel meg, amikor a REM alvás időtartama megemelkedett.

Végezetül, az általunk használt szelet-elektrofiziológiai megközelítésben a PPN-t annak bemeneteitől majdnem teljesen megfosztva vizsgáltuk. Mindamellet, hogy a modell ideális volt a lokális kapcsolatok feltérképezésére, a kapcsolataitól megfosztott mag neuronjain végzett mérések az in vivo mérések során tapasztaltakhoz képest némileg különböző hatásokat tárhattak fel. In vivo mérések során a PPN neuronok egymással és az ellenoldali kolinerg struktúrákkal, továbbá a szomatoszenzoros bemenetekkel és leszálló rostokkal való kapcsolata megtartott, míg a mi modellünkben (a szeletpreparátum lényegéből fakadóan) ezek a kapcsolatok elvesznek. Mivel mi a lokális kapcsolatok és modulációs hatások megfigyelésére törekedtünk, a modell alkalmas volt ezek vizsgálatára; azonban a neuromodulációs hatásoknak csupán egy részét térképezte fel.

Összefoglalva a fentieket, a fenti munkában azt mutattuk be, hogy a PPN neuronok CB1 receptor stimuláció hatására heterogén módon képesek változtatni membránpotenciáljukat és akcióspotenciál-tüzelési frekvenciájukat. A neuronális membránpotenciál változása az asztrociták CB1 receptorának aktiválása útján, glutamát felszabadulása és mGluR-ok aktivációja révén valósul meg. Ez a közvetett kannabinoid szabályozás úgy tűnik, hogy hatékonyan szabályozza a PPN neuronok működését, és

hozzájárul a PPN oszcillációs aktivitásának modulációjához, ami a kérgi lassú hullámú aktivitás és deszinkronizáció kialakításában, azok átmeneteinek modulálásában játszik szerepet.

A kannabinoid és muszkarinos hatások átfedést mutatnak a PPN neuronjain, ami szintén utalhat arra, hogy több neuromodulációs mechanizmus is hasonlóan végbemenő asztrocita-aktiváción keresztül valósul meg.

## Összefoglalás

A nucleus pedunculopontinus (PPN) a retikuláris aktivációs rendszer (RAS) egyik kolinerg magja, ami számos központi idegrendszeri funkciót szabályoz: a mozgásszabályozásban betöltött szerepe mellett a lassú hullámú alvás REM alvásba és ébrenlétbe való átmeneteinek szabályozása köthető hozzá. Azon túl, hogy a szubkortikális struktúrák kolinerg neuromodulációját biztosítja, a PPN is célpontja több neuromodulációs mechanizmusnak. A PPN-be injektált kannabinoidok képesek az alvás-ébrenlét ciklusokat modulálni, és a muszkarinos kolinerg, szerotoninerg, valamint az orexin és ghrelin által kialakított neuromodulációs hatások is ismertek.

Jelen munkában az endokannabinoid és a kolinerg neuromoduláció PPN neuronokra és asztrocitákra kifejtett hatását és az egyes hatások átfedéseit kívántam vizsgálni. Kísérleteimhez középagyi coronalis szeleteket használtam, amelyeken patch-clamp technika teljes sejtes elrendezésében és calcium imaging segítségével végeztem méréseket. A funkcionális eredményeken túl a sejtek morfológiai azonosítását és az 1-es típusú kannabinoid (CB1) receptor immunhisztokémiai módszerekkel végzett lokalizációját végeztem el.

A PPN-ben mind a neuronok, mind az asztrociták reagálnak CB1 receptor, valamint muszkarin típusú acetilkolin-receptor agonistákra. A reagáló neuronok esetében tónusos depolarizációt vagy hiperpolarizációt figyeltünk meg, és a CB1 receptor és a muszkarinos acetilkolin receptor agonisták jelenlétében kialakult hatások nagyrészt átfedtek egymással. A CB1 receptor agonistákra adott neuronális választ megelőzve és azzal párhuzamosan az asztrociták kalciumjeleinek frekvenciája jelentősen megemelkedett. A gyors szinaptikus transzmisszió vagy a neuronális akciós potenciál gátlása nem befolyásolta a CB1 receptor agonisták hatását, viszont az asztrociták kalciumhullámainak kialakulását gátló thapsigargin alkalmazása kivédte a kannabinoid hatásokat. Az I-es csoportú metabotróp glutamát receptorok (mGluR I) gátlása a hiperpolarizációt, míg a II-es csoportú mGluR (mGluR II) blokkolók a depolarizációt előzték meg. Mindezen hatások hiányoztak a CB1 receptor deficiens egérből preparált mintákon.

Mindent összevetve kijelenthetjük, hogy a muszkarinos acetilkolin és a CB1 receptorok stimulációja depolarizálhatja vagy hiperpolarizálhatja ugyanazon neuronokat. A CB1 receptor stimuláció esetében ennek hátterében az asztrociták aktivációja és az általuk történő glutamát felszabadítás áll. Az asztrocitákból a kannabinoid hatásra glutamát szabadul fel, mely aktiválja a környező idegsejtek különböző metabotróp glutamát receptorait, ezzel módosítva a PPN neuronok aktivitását.

## Summary

The PPN is known as a cholinergic nucleus of the reticular activating system (RAS). This structure has an outstanding role in regulation of sleep-wake cycles and contributes to regulation of movement and sensory gating. Injury of this nucleus was observed in different neurological or neuropsychiatric diseases as peduncular hallucinosis, schizophrenia or certain types of Parkinson's disease. PPN neurons do not form homogenous population, but several subgroups can be distinguished according to morphological and functional characteristics. Although the nucleus is known as a cholinergic nucleus, several non-cholinergic (glutamatergic, GABAergic) neurons are also located here. According to their relation to global brain states, more functional groups of cholinergic and non-cholinergic neurons can also be distinguished. We would like to investigate the neuromodulation of the cholinergic and cannabinoid neuromodulation in the pedunculopontine nucleus. 8- to 15-day-old C3H mice as well as mice-expressing tdTomato fluorescent proteins in a GAD2- or ChAT-dependent way were used from both sexes. After decapitation of the animal and removal of the brain, 200 µm thick coronal midbrain slices were cut with vibratome and were used patch-clamp experiments and calcium imaging techniques.

Neurons and astrocytes activated by cholinergic and cannabinoid agonists. We experienced depolarization, and hiperpolarization, and these effects was overloop in the pedunculopontine nucleus. The cannabinoid agonists increased the calcium wave frequency of the astrocytes. Blocked of the fast synaptic neurotransmission and the neuronal activity didn't affect to the CB1 receptor agonists effect, but the thapsigargin diminished these events.

In this study, we showed that cannabinoids and cholinergic agonist have an indirect heterogeneous effect on PPN neurons. The mechanism requires the involvement of astrocytes with functional CB1 receptors. Summarizing our results, we propose the following scheme of endocannabinoid modulation within the PPN. Active neurons synthesize and release endocannabinoids that stimulate neighboring astrocytes via CB1 receptors. This activation leads to consequential gliotransmitter release, which is glutamate in this particular case. The released glutamate will depolarize PPN neurons with mGluR II receptors and hyperpolarize the ones that express mGluR I.

## Irodalomjegyzék

**Agulhon C, Petravicz J, McMullen AB, Sweger EJ, Minton SK, Taves SR, Casper KB, Fiocco TA, McCarthy KD.** (2008): What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron*;59(6):932-46.

**Akopian A, Witkovsky P.** (1996): Activation of metabotropic glutamate receptors decreases a high-threshold calcium current in spiking neurons of the *Xenopus* retina. *Vis Neuroscience.*;13(3):549-57.

**Angulo MC, Kozlov AS, Charpak S, Audinat E** (2004): Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J. Neurosci* 24(31): 6920-6927.

**Araque A, Sanzgiri RP, Parpura V, Haydon PG.** (1998): Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci.*;18(17):6822-9.

**Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG.** (1998): Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci.*;10(6):2129-42.

**Araque A, Martin ED, Perea G, Arellano JI, Bun˜o W** (2002): Synaptically released acetylcholine evokes Ca<sup>2+</sup> elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J Neuroscience.*22:2443–2450

**Beck A, Nieden RZ, Schneider HP, Deitmer JW.** (2004): Calcium release from intracellular stores in rodent astrocytes and neurons in situ. *Cell Calcium*;35(1):47-58.

**Benarroch EE.** (2013): Pedunculo-pontine nucleus: functional organization and clinical implications. *Neurology* 80: 1148–1155

**Benke T, Hohenstein C, Poewe W, Butterworth B.** (2000): Repetitive speech phenomena in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*;69(3):319-24.

**Bezzi P, Volterra A.** (2001): A neuron-glia signalling network in the active brain. *Curr Opin Neurobiol.*;11(3):387-94.

**Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL, Seifert G, Steinhauser C, Pilati E, Volterra A** (2004): Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat. Neuroscience*; 7(6):613–620

**Blankman JL, Simon GM, Cravatt BF.** (2007): A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biol.*;14(12):1347-56.

**Bolla KI, Lesage SR, Gamaldo CE, Neubauer DN, Funderburk FR, Cadet JL, David PM, Verdejo-Garcia A, Benbrook AR** (2008) Sleep disturbance in heavy marijuana users. *Sleep* 31(6):901–908

**Bonhaus DW, Chang LK, Kwan J, Martin GR.** (1998): Dual activation and inhibition of adenylyl cyclase by cannabinoid receptor agonists: evidence for agonist-specific trafficking of intracellular responses. *J Pharmacol Exp Ther.*;287(3):884-8.

**Bouaboula M, Bourrie B, Rinaldi-Carmona M, Shire D, Le Fur G, Casellas P** (1995): Stimulation of cannabinoid receptor CB1 induces krox-24 expression in human astrocytoma cells. *J Biol Chem* 270: 13973-13980.

**Brown SP, Brenowitz SD, Regehr WG** (2003): Brief presynaptic bursts evoke synapse-specific retrograde inhibition mediated by endogenous cannabinoids. *Nat. Neuroscience* 6:1048–1057

**Brown, A.L.,** (2007): Novel cannabinoid receptors. *Br. J. Pharmacol.* 152, 567-575.

**Burnashev N , Schoepfer R , Monyer H , Ruppersberg JP , Günther W , Seeburg PH , Sakmann B.** (1992): Control by asparagine residues of calcium permeability and magnesium blockade in the NMDA receptor. *Science*; 257 (5075): 1415-9.

**Capogna M, Pearce RA** (2011): GABA<sub>A,slow</sub>: causes and consequences. *Trends in Neurosci* 34(2): 101-112.

**Carmignoto G, Pasti L, Pozzan T.** (1998): On the role of voltage-dependent calcium channels in calcium signaling of astrocytes in situ. *J Neurosci.*;18(12):4637-45.

**Carmignoto G, Fellin T** (2006): Glutamate release from astrocytes as a non-synaptic mechanism for a neuronal synchronization in the hippocampus. *J Physiol (Paris)* 99: 98-102.

**Castillo PE., Thomas J. Younts, Andres E. Chavez, and Yuki Hashimoto-dani.** (2012): Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron.*; 76(1):70-81

**Chavis P, Shinozaki H, Bockaert J, Fagni L** (1994) The metabotropic glutamate receptor types 2/3 inhibit L-type calcium channels via a pertussis toxin-sensitive G-protein in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci* 14(11 Pt 2):7067–7076

**Chavis P, Fagni L, Bockaert J, Lansman JB** (1995) Modulation of calcium channels by metabotropic glutamate receptors in cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* 34(8):929-937

**Chen N, Sugihara H, Sharma J, Perea G, Petravicz J, Le C, Sur M** (2012): Nucleus basalis-enabled stimulus-specific plasticity in the visual cortex is mediated by astrocytes. *PNAS* 109(41):E2832-41.

**Chicca A, Marazzi J, Nicolussi S, Gertsch J.** (2012): Evidence for bidirectional endocannabinoid transport across cell membranes. *J Biol Chem.* 5;287(41):34660-82.

**Cotrina ML, Lin JH, Alves-Rodrigues A, Liu S, Li J, Azmi-Ghadimi H, Kang J, Naus CC, Nedergaard M** (1998): Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc Natl Acad Sci USA*; 95(26):15735–15740

**D'Antoni S, Berretta A, Bonaccorso CM, Bruno V, Aronica E, Nicoletti F, Catania MV** (2008) Metabotropic glutamate receptors in glial cells. *Neurochem Res* 33(12):2436–2443

**D'Ascenzo M, Fellin T, Terunuma M, Revilla-Sanchez R, Meaney DF, Auberson YP, Moss SJ, Haydon PG** (2007) mGluR5 stimulates gliotransmission in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(6):1995–2000

**Deadwyler SA, Hampson RE, Mu J, Whyte A, Childers S.** (1995): Cannabinoids modulate voltage sensitive potassium A-current in hippocampal neurons via a cAMP-dependent process. *J Pharmacol Exp Ther.*;273(2):734-43.

**Demuth DG, Molleman A.** (2006): Cannabinoid signalling. *Life Science*;78:549–563.

**Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC.** (1988): Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.*;34(5):605-13.

**Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R.** (1992): Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*;258(5090):1946-9.

**Diana MA, Marty A.** (2004): Endocannabinoid-mediated short-term synaptic plasticity: depolarization-induced suppression of inhibition (DSI) and depolarization-induced suppression of excitation (DSE). *Br J Pharmacol.* 2004 May;142(1):9-19. Epub 2004 Apr 20.

**Di Marzo V, Melck D, Bisogno T, De Petrocellis L.** (1998): Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neuroscience*;21(12):521-8.

**Di Marzo V** (2011): Endocannabinoid signaling in the brain: biosynthetic mechanisms in the limelight. *Nat Neurosci* 14, 9–15.

**Díaz-Alonso J, Aguado T, de Salas-Quiroga A, Ortega Z, Guzmán M, Galve-Roperh I** (2014) CB1 Cannabinoid Receptor-Dependent Activation of mTORC1/Pax6 Signaling Drives Tbr2 Expression and Basal Progenitor Expansion in the Developing Mouse Cortex. *Cereb Cortex*; 25(9):2395-408.

**Drnotta T, Greasley P, Groblewski T. inventors, Astra Zeneca, assignee.** (2004): Screening assays for cannabinoid-ligand-type modulators of GPR55; World Intellectual Property Organization patent application. PCT/GB2004/000571;

**Duan S, Anderson CM, Keung EC, Chen Y, Chen Y, Swanson RA** (2003): P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J Neurosci* 23(4):1320–1328

**Feinberg I, Jones R, Walker JM, Cavness C, March J** (1975): Effects of high dosage delta-9-tetrahydrocannabinol on sleep patterns in man. *Clin Pharmacol Ther* 17(49):458–466

**Fellin T.** (2009): Communication between neurons and astrocytes: relevance to the modulation of synaptic and network activity. *J Neurochem.* 108: 533-544.

- Fernández-Ruiz J, Pazos MR, García-Arencibia M, Sagredo O, Ramos JA** (2008) Role of CB2 receptors in neuroprotective effects of cannabinoids. *Mol. Cell Endocrinol.*; 286(1 2)Supplement 1:S91–S96
- Ferraguti F, Shigemoto R** (2006): Metabotropic glutamate receptors. *Cell Tissue Res* 326(2):483–504
- Fields RD, Stevens-Graham B.** (2002): New insights into neuron-glia communication. *Science*;298(5593):556-62.
- Figueiredo M, Lane S, Tang F, Liu BH, Hewinson J, Marina N, Kasymov V, Souslova EA, Chudakov DM, Gourine AV, Teschemacher AG, Kasparov S.** (2011): Optogenetic experimentation on astrocytes. *Exp Physiol.*;96(1):40-50.
- Frank MG** (2013): Astroglial regulation of sleep homeostasis. *Curr Opin Neurobiol.*; 23(5):812–818
- Freund TF, Katona I, Piomelli D.** (2003): Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev.*;83(3):1017-66.
- Galve-Roperh, I., Ruead, D., Gomez del Pulgar, T., Velasco, G., Guzman, M.,** (2002): Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB(1) cannabinoid receptor. *Molecular Pharmacology* 62,1385–1392.
- Garcia-Rill E** (1991): The pedunculopontine nucleus. *Prog Neurobiol.* 36:363–389
- Garcia-Rill E, Charlesworth A, Heister D, Ye M, Hayar A** (2008): The developmental decrease in REM sleep: the role of transmitters and electrical coupling. *Sleep* 31(5):673–690
- Garcia-Rill E, Simon C, Smith K, Kezunovic N, Hyde J.** (2011): The pedunculopontine tegmental nucleus: from basic neuroscience to neurosurgical applications: arousal from slices to humans: implications for DBS. *J Neural Transm.*;118(10):1397-407.
- Gerdeman GL, Ronesi J, Lovinger DM.** (2002): Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat. Neurosci.*;5(5):446-51.
- Glass M, Dragunow M, Faull RLM.** (1997): Cannabinoid receptor in the human brain: a brain detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience*;77:299–318.).
- Goldman WF, Yarowsky PJ, Juhaszova M, Krueger BK, Blaustein MP.** (1994): Sodium/calcium exchange in rat cortical astrocytes. *J Neurosci.*;14(10):5834-43.
- Gourine AV, Kasymov V, Marina N, Tang F, Figueiredo MF, Lane S, Teschemacher AG, Spyer KM, Deisseroth K, Kasparov S.** (2010): Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science*;329(5991):571-5.
- Gulyás AI, Cravatt BF, Bracey MH, Dinh TP, Piomelli D, Boscia F, Freund TF.** (2004): Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur J Neurosci.* 441-58.

- Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennett MV, Charles AC, Kater SB.** (1999): ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci.* 15;19(2):520-8.
- Halassa MM, Florian C, Fellin T, Munoz JR, Lee SY, Abel T, Haydon PG, Frank MG.** (2009): Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss. *Neuron*;61(2):213-9.
- Hamilton N, Vayro S, Kirchhoff F, Verkhratsky A, Robbins J, Gorecki DC, Butt AM** (2008): Mechanisms of ATP-and glutamate-mediated calcium signaling in white matter astrocytes. *Glia*; 56:734-749
- Han J, Kesner P, Metna-Laurent M, Duan T, Xu L, Georges F, Koehl M, Abrous DN, Mendizabal-Zubiaga J, Grandes P, Liu Q, Bai G, Wang W, Xiong L, Ren W, Marsicano G, Zhang X** (2012) Acute cannabinoids impair working memory through astroglial CB1 receptor modulation of hippocampal LTD. *Cell* 148(5):1039–1050
- Harata N, Katayama J, Takeshita Y, Murai Y, Akaike N** (1996): Two components of metabotropic glutamate responses in acutely dissociated CA3 pyramidal neurons of the rat. *Brain Res* 711:223–233
- Hashimoto-dani Y, Ohno-Shosaku T, Watanabe M, Kano M.** (2007): Roles of phospholipase C beta and NMDA receptor in activity-dependent endocannabinoid release. *J Physiol.*;15;584(Pt 2):373-80.
- Hegy Z, Kis G, Holló K, Ledent C, Antal M** (2009): Neuronal and glial localization of the cannabinoid-1 receptor in the superficial spinal dorsal horn of the rodent spinal cord. *Eur J Neurosci.*; 30(2):251–262
- Hegy Z, Hollo´ K, Kis G, Mackie K, Antal M** (2012): Differential distribution of diacylglycerol lipase-alpha and N-acylphosphatidylethanolamine- specific phospholipase d immunoreactivity in the superficial spinal dorsal horn of rats. *Glia* 60(9):1316–1329
- Heifets BD, Chevalyere V, Castillo PE.** (2008): Interneuron activity controls endocannabinoid-mediated presynaptic plasticity through calcineurin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 22;105(29):10250-5.
- Herrera-Solis A, Vásquez KG, Prospéro-García O** (2010): Acute and subchronic administration of anandamide or oleamide increases REM sleep in rats. *Pharmacol Biochem Behav.*; 95:106–112
- Hermes ML, Renaud LP** (2011): Postsynaptic and presynaptic group II metabotropic glutamate receptor activation reduces neuronal excitability in rat midline paraventricular thalamic nucleus. *J Pharmacol Exp Ther* 336(3):840–849
- Hillard CJ, Manna S, Greenberg MJ, DiCamelli R, Ross RA, Stevenson LA, Murphy V, Pertwee RG, Campbell WB** (1999): Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB1). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289(3):1427–1433.

**Himpens B, Droogmans G, Casteels R** (1991): Carbachol-induced nonspecific desensitization in guinea-pig ileum. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 343:580–587.

**Holtzclaw, L.A., Pandhit, S., Bare, D.J., Mignery, G.A., and Russell, J.T.** (2002): Astrocytes in adult rat brain express type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Glia*; 39: 69–84

**Howlett AC, Fleming RM.** (1984): Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol.*;26(3):532-8.

**Hubert GW, Smith Y** (2004): Age-related changes in the expression of axonal and glial group I metabotropic glutamate receptor in the rat substantia nigra pars reticulata. *J Comp Neurol* 475(1):95–106

**Irie T, Fukui I, Ohmori H** (2006) Activation of GIRK channels by muscarinic receptors and group II metabotropic glutamate receptors suppresses Golgi cell activity in the cochlear nucleus of mice. *J Neurophysiol* 96(5):2633–2644

**Jabaudon D, Shimamoto K, Yasuda-Kamatani Y, Scanziani M, Gahwiler BH, Gerber U** (1999): Inhibition of uptake unmasks rapid extracellular turnover of glutamate of nonvesicular origin. *PNAS* 96: 8733-8738.

**Janzen J., Ent D. van 't, Lemstra A. W. Berendse H. W., Barkhof F., Foncke E. M. J.** (2012): The pedunculopontine nucleus is related to visual hallucinations in Parkinson's disease: preliminary results of a voxel-based morphometry study. *Journal of Neurology*, Volume 259, Issue 1, pp 147-154,

**Jenkinson N, Nandi D, Muthusamy K, Ray NJ, Gregory R, Stein JF, Aziz TZ** (2009): Anatomy, physiology, and pathophysiology of the pedunculopontine nucleus. *Mov. Disord.* 24(3):319–328

**Jian K, Cifelli P, Pignatelli A, Frigato E, Belluzzi O** (2010): Metabotropic glutamate receptors 1 and 5 differentially regulate bulbar dopaminergic cell function. *Brain Res* 1354:47–63

**Jourdain P, Bergersen LH, Bhaukaurally K, Bezzi P, Santello M, Domercq M, Matute C, Tonello F, Gundersen V, Volterra A.** (2007): Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci.*;10(3):331-9.

**Kang Y, Kitai ST.** (1990): Electrophysiological properties of pedunculopontine neurons and their postsynaptic responses following stimulation of substantia nigra reticulata. *Brain Res.* 3;535(1):79-95.

**Kato HK, Kassai H, Watabe AM, Aiba A, Manabe T** (2012) Functional coupling of the metabotropic glutamate receptor, InsP3 receptor and L-type Ca<sup>2+</sup> channel in mouse CA1 pyramidal cells. *J Physiol* 590(Pt 13):3019–3034

- Katona I, Sperlagh B, Sik A, Kafalvi A, Vizi ES, Mackie K, Freund TF** (1999): Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci.*; 19:4544–4558
- Katona I, Urban GM, Wallace M, Ledent C, Jung KM, Piomelli D, et al.** (2006): Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci* 26: 5628–5637
- Katona I, Freund TF** (2012): Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annu Rev. Neurosci.*; 35:529–558
- Kim J, Nakajima K, Oomura Y, Wayner MJ, Sasaki K.** (2009): Orexin-A and ghrelin depolarize the same pedunculo-pontine tegmental neurons in rats: an in vitro study. *Peptides* 2009; 30:1328–1335.
- Kirischuk S, Scherer J, Kettenmann H, Verkhratsky A.** (1995): Activation of P2-purinoreceptors triggered Ca<sup>2+</sup> release from InsP3-sensitive internal stores in mammalian oligodendrocytes. *J Physiol.*;483 ( Pt 1):41-57.
- Kirischuk S, Tuschick S, Verkhratsky A, Kettenmann H.** (1996): Calcium signalling in mouse Bergmann glial cells mediated by alpha1-adrenoreceptors and H1 histamine receptors. *Eur J Neurosci.*;8(6):1198-208.
- Kirischuk S, Kettenmann H, Verkhratsky A.** (1997): Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger modulates kainate-triggered Ca<sup>2+</sup> signaling in Bergmann glial cells in situ. *FASEB J.*;11(7):566-72.
- Kirischuk S, Kettenmann H, Verkhratsky A.** (2007): Membrane currents and cytoplasmic sodium transients generated by glutamate transport in Bergmann glial cells. *Pflugers Arch.*;454(2):245-52.
- Knoflach F, Kemp JA** (1998): Metabotropic glutamate group II receptors activate a G protein-coupled inwardly rectifying K<sup>+</sup> current in neurones of the rat cerebellum. *J Physiol* 509(Pt 2):347–354
- Kohlmeier KA, Christensen MH, Kristensen MP, Kristiansen U** (2013): Pharmacological evidence of functional inhibitory metabotropic glutamate receptors on mouse arousal-related cholinergic laterodorsal tegmental neurons. *Neuropharmacology* 66:99–113
- Kozlov AS, Angulo MC, Audinat E, Charpak S** (2006): Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes. *PNAS* 103(26): 10058-10063
- Kreitzer AC, Regehr WG.** (2001): Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron.*;29(3):717-27.
- Koszeghy A, Vincze J, Rusznak Z, Fu Y, Paxinos G, Csernoch L, Szucs G** (2012): Activation of muscarinic receptors increases the activity of the granule neurons of the rat dorsal cochlear nucleus—a calcium imaging study. *Pflugers Arch.*; 463(6):829–844
- Kuga N, Sasaki T, Takahara Y, Matsuki N, Ikegaya Y** (2011): Large-scale calcium waves traveling through astrocytic networks in vivo. *J Neurosci.* 16;31(7):2607-14.

**Le Meur K, Mendizabal-Zubiaga J, Grandes P, Audinat E.** (2012): GABA release by hippocampal astrocytes. *Front Comput Neurosci.* 6:59.

**Leonard CS and Llinas RR.** (1990): Electrophysiology of mammalian pedunculopontine and laterodorsal tegmental neurons in vitro: implications for the control of REM sleep. In: *Brain Cholinergic Systems*, edited by Steriade M and Biesold D. Oxford, UK: Oxford Science, p. 205–223.

**Leonard CS, Llinás R.** (1994): Serotonergic and cholinergic inhibition of mesopontine cholinergic neurons controlling REM sleep: an in vitro electrophysiological study. *Neuroscience*; 59:309–330.

**Libri V, Constanti A, Zibetti M, Postlethwaite M** (1997): Metabotropic glutamate receptor subtypes mediating slow inward tail current (IADP) induction and inhibition of synaptic transmission in olfactory cortical neurones. *Br J Pharmacol* 120(6):1083–1095

**Liu QS, Xu Q, Kang J, Nedergaard M.** (2004): Astrocyte activation of presynaptic metabotropic glutamate receptors modulates hippocampal inhibitory synaptic transmission. *Neuron Glia Biol.*;1(4):307-16.

**Liu L, Wong TP, Pozza MF, Lingenhoehl K, Wang Y, Sheng M, Auberson YP, Wang YT.** (2004): Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science*;14;304(5673):1021-4.

**Lovinger DM** (2008) Presynaptic modulation by endocannabinoids. *Handbook of Experimental Pharmacology*;184: 435–477

**Lőrincz ML, Bao Y, Crunelli V, Hughes SW** (2009): ATP-dependent infra-slow (<0.1 Hz) oscillations in thalamic networks. *PLoS ONE* 4(2): e4447.

**Macdonald CL, Silva GA.** (2013): A positive feedback cell signaling nucleation model of astrocyte dynamics. *Front Neuroeng.*;10;6:4.

**Mackie K , Hille B** (1992): Cannabinoids inhibit N-type calcium current in neuroblastoma-glioma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*;89:3825–3829

**Mackie K , Lai Y, Westenbroek R, Mitchell R** (1995): Cannabinoids activate an inwardly-rectifying potassium conductance and inhibit Q-type voltage-dependent calcium currents in AtT-20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci.*;15:6552– 6561.

**Madisen L, Zwingman TA, Sunkin SM, Oh SW, Zariwala HA, Gu H, Ng LL, Palmiter RD, Hawrylycz MJ, Jones AR, Lein ES, Zeng H.** (2010): A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci.*;13(1):133-40.

**Malarkey EB, Parpura V.** (2007): Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochem. Int.*;52(1-2):142-54.

- Maneuf Y. P. and Brotchie J. M.** (1997): Paradoxical action of the cannabinoid WIN 55,212-2 in stimulated and basal cyclic AMP accumulation in rat globus pallidus slices. *Br. J. Pharmacol.*;120,1397–1398
- Mannaioni G, Marino MJ, Valenti O, Traynelis SF, Conn PJ** (2001) Metabotropic glutamate receptors 1 and 5 differentially regulate CA1 pyramidal cell function. *J Neurosci* 21(16):5925–5934
- Martinez-Gonzalez C, Bolam JP, Mena-Segovia J.** (2011): Topographical organization of the pedunculopontine nucleus. *Frontiers Neuroanat.*;5;5:22.
- Martinez-Vargas M., Murillo-Rodriguez E., Gonzalez-Rivera R., Landa A., Mndez-Dazm., Prospro-Garca O., Navarro L.** (2003): Sleep modulates cannabinoid receptor 1 expression in the pons of rats. *Neuroscience.*;117:197–201.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI.** (1990): Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.*;346(6284):561-4.
- Matyash M, Matyash V, Nolte C, Sorrentino V, Kettenmann H.** (2002): Requirement of functional ryanodine receptor type 3 for astrocyte migration. *FASEB J.*;16(1):84-6.
- Mesulam, M. M., Mufson, E. J., Wainer, B. H., and Levey, A. I.** (1983). Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1–Ch6). *Neuroscience* 10, 1185–1201.
- Mena-Segovia J, Sims HM, Magill PJ, Bolam JP** (2008): Cholinergic brainstem neurons modulate cortical gamma activity during slow oscillations. *J Physiol.*; 586(12):2947–2960
- Mena-Segovia J, Micklem BR, Nair-Roberts RG, Ungless MA, Bolam JP.** (2009): GABAergic neuron distribution in the pedunculopontine nucleus defines functional subterritories. *J Comp Neurol.*;1;515(4):397-408.
- Mendelson WB, Basile AS.** (1999): The hypnotic actions of oleamide are blocked by a cannabinoid receptor antagonist. *NeuroReport* 10: 3237–3239
- Minelli A, Castaldo P, Gobbi P, Salucci S, Magi S, Amoroso S** (2007): Cellular and subcellular localization of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger protein isoforms, NCX1, NCX2, and NCX3 in cerebral cortex and hippocampus of adult rat. *Cell Calcium* 41, 221-234
- Min R, Nevian T** (2012): Astrocyte signaling controls spike timing dependent depression at neocortical synapses. *Nat. Neuroscience*;15(5):746–753
- Moldrich G, Wenger T** (2000): Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. *Peptides*;21(11):1735–1742
- Molina-Holgado F, Pinteaux E, Moore JD, Molina-Holgado E, Guaza C, Gibson RM, Rothwell NJ** (2003): Endogenous interleukin-1 receptor antagonist mediates anti-inflammatory and neuroprotective actions of cannabinoids in neurons and glia. *J. Neuroscience*; 23(16):6470–6474

**Mu J, Zhuang SY, Kirby MT, Hampson RE, Deadwyler SA.** (1999): Cannabinoid receptors differentially modulate potassium A and D currents in hippocampal neurons in culture. *J Pharmacol Exp Ther.*;291(2):893-902.

**Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M.** (1993): Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature (Lond.)*;365:61–65.

**Murillo-Rodríguez E, Sánchez-Alavez M, Navarro L, Martínez- González D, Drucker-Colín R, Prospéro-García O** (1998): Anandamide modulates sleep and memory in rats. *Brain Res* 812(1–2):270–274

**Murillo-Rodríguez E, Cabeza R, Méndez-Díaz M, Navarro L, Prospéro-García O** (2001): Anandamide-induced sleep is blocked by SR141716A, a CB1 receptor antagonist and by U73122, a phospholipase C inhibitor. *NeuroReport* 12(10):2131–2136

**Murillo-Rodríguez E.** (2008): The role of the CB1 receptor in the regulation of sleep. *Prog Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry*; 32:1420–1427.

**Murillo-Rodríguez E, Millán-Aldaco D, Di Marzo V, Drucker-Colín R** (2008): The anandamide membrane transporter inhibitor VDM- 11, modulates sleep and c-Fos expression in the rat brain. *Neuroscience*; 157:1–11

**Navarrete M, Araque A** (2008): Endocannabinoids mediate neuron astrocyte communication. *Neuron*; 58:883–893

**Navarrete M, Araque A** (2010): Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron*; 68:113–126

**Navarrete M, Perea G, Fernandez de Sevilla D, Gómez-Gonzalo M, Núñez A, Martín ED, Araque A** (2012) Astrocytes mediate in vivo cholinergic-induced synaptic plasticity. *PLoS Biol* 10(2):e1001259

**Ndubaku U, de Bellard ME.** (2008): Glial cells: old cells with new twists. *Acta Histochem.*;110(3):182-95.

**Nett WJ, Oloff SH, McCarthy KD** (2002) Hippocampal astrocytes in situ exhibit calcium oscillations that occur independent of neuronal activity. *J Neurophysiol* 87(1):528–537

**Newman EL, Gupta K, Climer JR, Monaghan CK, Hasselmo ME.** (2012): Cholinergic modulation of cognitive processing: insights drawn from computational models. *Front. Behav. Neurosci.*;13;6:24.

**Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Kerr JN, Helmchen F** (2004): Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nat Methods* 1:31–37

**Niswender CM, Conn PJ** (2010) Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50:295–322

**Ohno-Shosaku T, Maejima T, Kano M.** (2001): Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron*. 29(3):729-38

**Okamoto Y, Wang J, Morishita J, Ueda N.** (2007): Biosynthetic pathways of the endocannabinoid anandamide. *Chem Biodivers.*;4:1842–1857.

**Olszewski J., Baxter D.** (1982): *Cytoarchitecture of the Human Brain Stem*. Basel: S Karger AG

**Overton HA, Babbs AJ, Doel SM, Fyfe MC, Gardner LS, Griffin G, Jackson HC, Procter MJ, Rasamison CM, Tang-Christensen M, Widdowson PS, Williams GM, Reynet C.** (2006): Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell Metab.*;3(3):167-75

**Pace-Schott EF** (2009) Sleep architecture. In: Stickgold R, Walker M (eds) *The neuroscience of sleep*. Elsevier, Amsterdam, pp 10–17

**Paluzzi S, Alloisio S, Zappettini S, Milanese M, Raiteri L, Nobile M, Bonanno G.** (2007): Adult astroglia is competent for Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger-operated exocytotic glutamate release triggered by mild depolarization. *J. Neurochem.*;103(3):1196-207.

**Palygin O, Lalo U, Verkhratsky A, Pankratov Y.** (2010): Ionotropic NMDA and P2X1/5 receptors mediate synaptically induced Ca<sup>2+</sup> signalling in cortical astrocytes. *Cell Calcium.*;48(4):225-31

**Palygin O, Lalo U, Pankratov Y.** (2011): Distinct pharmacological and functional properties of NMDA receptors in mouse cortical astrocytes. *Br. J. Pharmacol.*;163(8):1755-66.

**Panatier A, Theodosis DT, Mothet JP, Touquet B, Pollegioni L, Poulain DA, Oliet SH** (2006): Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell.*;125(4):775-84.

**Park EJ, Nam RH, Choi S, Lee CJ.** (2004): Carbachol induces a form of long-term potentiation in lateral amygdala. *Neuroreport*.7;15(8):1339-43.

**Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jeftinija K, Jeftinija S, Haydon PG** (1994): Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature*; 369(6483):744–747

**Parpura, V., Grubisic, V., Verkhratsky, A.,** (2011): Ca<sup>2+</sup> sources for the exocytotic release of glutamate from astrocytes. *Biochim. Biophys. Acta.*; 1813, 984–991.

**Parri HR, Gould TM, Crunelli V** (2001): Spontaneous astrocytic Ca<sup>2+</sup> oscillations in situ drive NMDA-mediated neuronal excitation. *Nat. Neuroscience*;4:803–812.

**Parri HR, Crunelli V.** (2002): Astrocytes, spontaneity, and the developing thalamus. *J. Physiol. Paris.*;96(3-4):221-30.

**Parri HR, Crunelli V.** (2003): The role of Ca<sup>2+</sup> in the generation of spontaneous astrocytic Ca<sup>2+</sup> oscillations. *Neuroscience*;120(4):979-92.

**Parri et al.** (2004): A heterogeneity of responses to synaptic stimulation in astrocytes in thalamic astrocytes. *Society for Neuroscience Abstracts* 20, 976.4.

**Parri HR, Gould TM, Crunelli V** (2010) Sensory and cortical activation of distinct glial cell subtypes in the somatosensory thalamus of young rats. *Eur J Neurosci* 32(1):29–40

**Partridge JG, Lewin AE, Yasko JR, Vicini S** (2014): Contrasting actions of Group I metabotropic glutamate receptors in distinct mouse striatal neurones. *J Physiol*

**Pasantes Morales H, Schousboe A** (1988): Volume regulation in astrocytes: a role for taurine as an osmoeffector. *J Neurosci Res* 20(4):503–509

**Pasti L, Volterra A, Pozzan T, Carmignoto G** (1997): Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J. Neuroscience*;17:7817–7830.

**Paxinos G, Franklin KBJ** (2004): *The mouse brain atlas in stereotaxic coordinates*. Elsevier, USA

**Perea G, Araque A.** (2005): Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium*;38(3-4):375-82.

**Perea G, Araque A** (2005): Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J. Neuroscience*; 25(9): 2192-2203.

**Perea G, Araque A.** (2005): Synaptic regulation of the astrocyte calcium signal. *J. Neural Transm.*;112(1):127-35.

**Perea G, Araque A.** (2007): Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science.*;24;317(5841):1083-6.

**Perea G, Navarrete M, Araque A** (2009): Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neuroscience*; 32(8):421–431

**Perea G, Yang A, Boyden ES, Sur M** (2014): Optogenetic astrocyte activation modulates response selectivity of the visual cortex neurons in vivo. *Nat. Commun.*;5:3262

**Pereira JB, Ibarretxe-Bilbao N, Marti MJ, Compta Y, Junqué C, Bargallo N, Tolosa E.** (2012): Assessment of cortical degeneration in patients with Parkinson's disease by voxel-based morphometry, cortical folding, and cortical thickness. *Hum Brain Mapp.*;33(11):2521-34.

**Petralia RS, Wang YX, Niedzielski AS, Wenthold RJ** (1996): The metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localizations. *Neuroscience* 71(4):949–976

**Petravicz J, Fiacco TA, McCarthy KD.** (2008): Loss of IP3 receptor-dependent Ca<sup>2+</sup> increases in hippocampal astrocytes does not affect baseline CA1 pyramidal neuron synaptic activity. *J. Neurosci.*;28(19):4967-73

**Pirttimaki TM, Hall SD, Parri HR** (2011) Sustained neuronal activity generated by glial plasticity. *J Neurosci* 31(21):7637–7647

**Pirttimaki TM, Parri HR** (2012) Glutamatergic input–output properties of thalamic astrocytes. *Neuroscience* 205:18–28

**Pirttimaki T, Parri HR, Crunelli V.** (2013): Astrocytic GABA transporter GAT-1 dysfunction in experimental absence seizures. *J. Physiol.*;15;591(Pt 4):823-33.

**Pivik RT, Zarcone V, Dement WC, Hollister LE** (1972): Delta-9-tetrahydrocannabinol and synhexl: effects on human sleep patterns. *Clin. Pharmacol. Ther.*;13: 426-436

**Poisik OV, Mannaioni G, Traynelis S, Smith Y, Conn PJ** (2003): Distinct functional roles of the metabotropic glutamate receptors 1 and 5 in the rat globus pallidus. *J Neurosci* 23(1):122–130

**Rainnie DG, Holmes KH, Shinnick-Gallagher P** (1994): Activation of postsynaptic metabotropic glutamate receptors by trans-ACPD hyperpolarizes neurons of the basolateral amygdala. *J Neurosci* 14:7208–7220

**Reese NB, Garcia-Rill E, Skinner RD** (1995): The pedunculopontine nucleus—auditory input, arousal and pathophysiology. *Prog Neurobiol.*;42:105–133

**Rinaldo L, Hansel C.** (2013): Muscarinic acetylcholine receptor activation blocks long-term potentiation at cerebellar parallel fiber-Purkinje cell synapses via cannabinoid signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110:11181–11186.

**Robbe D, Kopf M, Remaury A, Bockaert J, Manzoni OJ** (2002a): Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 99: 8384–8388.

**Rodriguez JJ, Mackie K, Pickel VM** (2001): Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat Caudate putamen nucleus. *J. Neuroscience*; 21(3):823–833

**Rojas H, Colina C, Ramos M, Benaim G, Jaffe EH, Caputo C, DiPolo R.** (2007): Na<sup>+</sup> entry via glutamate transporter activates the reverse Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange and triggers Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in rat cerebellar Type-1 astrocytes. *J. Neurochem.*;100(5):1188-202.

**Romano MR, Lograno MD.** (2013): Signaling cross-talk between cannabinoid and muscarinic systems activates Rho-kinase and increases the contractile responses of the bovine ciliary muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 2013; 702(1–3):174–179.

**Ros H, Magill PJ, Moss J, Bolam JP, Mena-Segovia J.** (2010): Distinct types of non-cholinergic pedunculopontine neurons are differentially modulated during global brain states. *Neuroscience*; 170:78–91.

**Rosenberg PA, Knowles R, Knowles KP, Li Y** (1994): Beta adrenergic receptor-mediated regulation of extracellular adenosine in cerebral cortex in culture. *J. Neuroscience*; 14(5 Pt 2):2953–2965

**Rueda-Orozco PE, Soria-Gomez E, Montes-Rodriguez CJ, Martinez-Vargas M, Galicia O, Navarro L, et al.** (2008): A potential function of endocannabinoids in the selection of a navigation strategy by rats. *Psychopharmacology (Berl)*;198:565–576.

**Salio C, Fischer J, Franzoni MF, Conrath M.** (2002): Pre- and postsynaptic localizations of the CB1 cannabinoid receptor in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience*;110(4):755-64.

**Schipke CG, Haas B, Kettenmann H.** (2008): Astrocytes discriminate and selectively respond to the activity of a subpopulation of neurons within the barrel cortex. *Cereb. Cortex*;18(10):2450-9

**Schoepp DD** (2001): Unveiling the functions of presynaptic metabotropic glutamate receptors in the central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther* 299(1):12–20

**Schools GP, Kimelberg HK** (1999): mGluR3 and mGluR5 are the predominant metabotropic glutamate receptor mRNAs expressed in hippocampal astrocytes acutely isolated from young rats. *J Neurosci Res* 58(4):533–543

**Schweitzer P** (2000): Cannabinoids decrease the K<sup>+</sup> M-Current in hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci* 20:51–58

**Sheppard C.A., Simpson P.B., Sharp A.H., Nucifora F.C., Ross C.A., Lange G.D., Russell J.T.** (1997): Comparison of type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor distribution and subcellular Ca<sup>2+</sup> release sites that support Ca<sup>2+</sup> waves in cultured astrocytes. *J. Neurochem.*; 68, pp. 2317–2327

**Sherman SM** (2014): The function of metabotropic glutamate receptors in thalamus and cortex. *Neuroscientist* 20(2):136–149

**Shibasaki K, Ikenaka K, Tamalu F, Tominaga M, Ishizaki Y** (2014): A novel subtype of astrocytes expressing TRPV4 regulates neuronal excitability via release of gliotransmitters. *J Biol Chem.*; 289(21):14470-80.

**Singla S, Kreitzer AC, Malenka RC.** (2007): Mechanisms for synapse specificity during striatal long-term depression. *J. Neuroscience*; 27: 5260–5264.

**Smith RS, Weitz CJ, Araneda RC** (2009): Excitatory actions of noradrenaline and metabotropic glutamate receptor activation in granule cells of the accessory olfactory bulb. *J Neurophysiol* 102(2):1103–1114

**Sofroniew M. V. and Vinters H. V.** (2010): Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.*; 119(1): 7–35.

**Soltész I, Alger BE, Kano M, Lee SH, Lovinger DM, Ohno-Shosaku T, Watanabe M.** (2015): Weeding out bad waves: towards selective cannabinoid circuit control in epilepsy. *Nat Rev Neurosci.* 16(5):264-77.

**Sugiura Y, Ko CP** (1997): Novel modulatory effect of L-type calcium channels at newly formed neuromuscular junctions. *J. Neuroscience;* 17: 1101–1111

**Stella N** (2004): Cannabinoid signaling in glial cells. *Glia;* 48 (4):267–277

**Stella N** (2009): Endocannabinoid signalling in microglial cells. *Neuropharmacology.* 244-253

**Ster J, Mateos JM, Grewe BF, Coiret G, Corti C, Corsi M, Helmchen F, Gerber U** (2011): Enhancement of CA3 hippocampal network activity by activation of group II metabotropic glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(24):9993–9997

**Steriade M., Pare D., Parent A., Smith Y.** (1988): Projections of cholinergic and non-cholinergic neurons of the brainstem core to relay and associational thalamic nuclei in the cat and macaque monkey. *Neuroscience* 25, 47–67. 10.1016/0306-4522(88)90006-1

**Steriade M, Datta S, Paré D, Oakson G, Curró Dossi RC** (1990): Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems. *J Neurosci* 10(8):2541–2559

**Steriade, M. & McCarley, R. W.** (2005): Brainstem control of wakefulness and sleep. New York: Springer. 728pp

**Szatkowski M, Barbour B, Attwell D** (1990): Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature* 348(6300):443–446

**Takakusaki K, Shiroyama T, Yamamoto T, Kitai ST.** (1996): Cholinergic and noncholinergic tegmental pedunculopontine projection neurons in rats revealed by intracellular labeling. *J Comp Neurol.* 29;371(3):345-61.

**Takuma K, Matsuda T, Hashimoto H, Asano S, Baba A.** (1994): Cultured rat astrocytes possess Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Glia;* 12(4):336-42.

**Taniguchi, H., He, M., Wu, P., Kim, S., Paik, R., Sugino, K., et al.** (2011). A resource of Cre driver lines for genetic targeting of GABAergic neurons in cerebral cortex. *Neuron* 71, 995–1013.

**Tarokh L, Carskadon MA** (2009): Sleep in adolescents. In: Stickgold R, Walker M (eds) *The neuroscience of sleep.* Elsevier, Amsterdam, pp 70–77

**Van der Stelt M, Trevisani M, Vellani V, De Petrocellis L, Schiano Moriello A, Campi B, McNaughton P, Geppetti P, Di Marzo V.** (2005): Anandamide acts as an intracellular messenger amplifying Ca<sup>2+</sup> influx via TRPV1 channels. *EMBO J.*; 24(17):3026-37.

**Vaughn LK, Denning G, Stuhr KL, de Wit H, Hill MN, Hillard CJ.** (2010): Endocannabinoid signalling: has it got rhythm? *Br. J. Pharmacol.*; 160(3):530-43.

- Verkhratsky A, Kettenmann H.** (1996): Calcium signalling in glial cells.: Trends Neurosci.;19(8):346-52.
- Verkhratsky A, Rodríguez JJ, Parpura V.** (2012): Calcium signalling in astroglia. Mol. Cell Endocrinol.;353(1-2):45-56.
- Volterra A, Bezzi P** (2002): Release of transmitters from glial cells, chap 13. In: Volterra A et al (eds) The tripartite synapse: glia insynaptic neurotransmission. Oxford University Press, Oxford, pp 164–184
- Walter L, Stella N** (2003): Endothelin-1 increases 2-arachidonoylglycerol (2-AG) production in astrocytes. Glia; 44(1):85–90
- Warr O, Takahashi M, Attwell D** (1999): Modulation of extracellular glutamate concentration in rat brain slices by cystine–glutamate exchange. J. Physiol. 514(Pt 3):783
- Wilson RI, Nicoll RA** (2001): Endogenous cannabinoids mediate retrograde signaling at hippocampal synapses. Nature; 410:588–592
- Wilson-Poe AR, Mitchell VA, Vaughan CW** (2013): Postsynaptic mGluR mediated excitation of neurons in midbrain periaqueductal grey. Neuropharmacology 66:348–354
- Winn P.** (2006): How best to consider the structure and function of the pedunclopontine tegmental nucleus: evidence from animal studies. J. Neurol. Sci.; 248 (1–2):234–250.
- Woolf NJ, Butcher LL.** (2011) Cholinergic systems mediate action from movement to higher consciousness. Behav Brain Res. 221(2):488-98.
- Xi ZX, Baker DA, Shen H, Carson DS, Kalivas PW** (2002): Group II metabotropic glutamate receptors modulate extracellular glutamate in the nucleus accumbens. J Pharmacol Exp Ther.;300(1):162–171
- Ye ZC, Wyeth MS, Baltan-Tekkok S, Ransom BR** (2003): Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. J. Neuroscience; 23(9):3588–3596
- Ye M, Hayar A, Strotman B, Garcia-Rill E.** (2010): Cholinergic modulation of fast inhibitory and excitatory transmission to pedunclopontine thalamic projecting neurons. J Neurophysiol 2010; 103:2417–2432.
- Zhang Z, Séguéla P** (2010): Metabotropic induction of persistent activity in layers II/III of anterior cingulate cortex. Cereb Cortex 20(12):2948–2957
- Zimmer A, Zimmer AM, Hohmann AG, Herkenham M, Bonner TI** (1999): Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. Proc Natl Acad Sci USA 96:5780–5785.
- Zitella LM, Mohsenian K, Pahwa M, Gloeckner C, Johnson MD.** (2013): Computational modeling of pedunclopontine nucleus deep brain stimulation. J Neural Eng.;10(4):045005.

**Zur Nieden R, Deitmer JW** (2006): The role of metabotropic glutamate receptors for the generation of calcium oscillations in rat hippocampal astrocytes in situ. *Cereb Cortex* 16(5):676–687

## Közlemények listája



**DEBRECENI EGYETEM**  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/188/2015.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kovács Adrienn  
Neptun kód: OS6FE9  
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kovács, A.**, Bordás, C., Pál, B.: Cholinergic and endocannabinoid neuromodulatory effects overlap on neurons of the pedunculo-pontine nucleus of mice.  
*Neuroreport*. 26 (5), 273-278, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/doi: 10.1097/WNR.0000000000000342>  
IF:1.52 (2014)
2. Kőszeghy, Á., **Kovács, A.**, Bíró, T., Szűcs, P., Vincze, J., Hegyi, Z., Antal, M., Pál, B.:  
Endocannabinoid signaling modulates neurons of the pedunculo-pontine nucleus (PPN) via astrocytes..  
*Brain. Struct. Funct.* 220 (5), 3023-3041, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/DOI 10.1007/s00429-014-0842-5>  
IF:5.618 (2014)





---

**További Közlemények**

3. Bordás, C., **Kovács, A.**, Pál, B.: The M-current contributes to high threshold membrane potential oscillations in a cell type-specific way in the pedunculo-pontine nucleus of mice.  
*Front. Cell. Neurosci.*, 9 Article ID 121, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2015.00121>  
IF:4.289 (2014)

**A közlő folyóiratok összesített impact faktora: 11,427**

**A közlő folyóiratok összesített impact faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
7,138**

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

Debrecen, 2015.09.14.



## Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani Prof. Dr. Csernoch Lászlónak, hogy lehetővé tette számomra, hogy a DE ÁOK Élettani Intézetében, a Molekuláris Orvostudományi Doktori Iskola keretein belül végezhessem munkámat. Köszönetet szeretnék továbbá mondani témavezetőmnek Dr. Pál Balázsnak, Dr. Szűcs Péternek, Dr. Kőszeghy Áronnak, Dr. Vincze Jánosnak és Bordás Csillának (DE ÁOK Élettani Intézet) szakmai segítségükért a kísérletek elvégzésében, elemzésében és interpretálásában. Köszönetet mondok továbbá Prof. Dr. Bíró Tamásnak (DE ÁOK Immunológiai Intézet), Dr. Hegyi Zoltánnak és Prof. Dr. Antal Miklósnak (DE ÁOK Anatómiai Intézet) egyes kísérletek elvégzésében nyújtott segítségükért.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani családomnak és páromnak, hogy biztosították számomra a stabil, nyugodt, biztos érzelmi háttérrel munkám során, illetve a PhD védésre való felkészülés alatt.

A fenti munkát a Nemzeti Agykutató Program (KTIA\_13\_NAP-A\_I/10) és a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024, TÁMOP-4.2.2/A-11/1-KONV-2012-0025 és a TÁMOP-4.2.2B-15/1/KONV-2015-0001 támogatták.

