

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Asztrocita-függő és direkt neuronális neuromodulációs hatások egér és
humán agyszeleteken**

Csemer Andrea

Témavezető: Dr. Pál Balázs Zoltán



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2024.

Tartalomjegyzék

Rövidítések	4
Bevezetés	7
Irodalmi áttekintés	8
Az asztrociták	8
<i>Az asztrociták és a kalcium</i>	9
<i>Az asztrociták és a glutamát</i>	10
Glutamát receptorok	12
<i>Az NMDA receptorok</i>	12
<i>Metabotróp glutamát receptorok</i>	13
A szinaptikus plaszticitás	15
<i>A hosszú távú potencírozás (LTP)</i>	15
<i>Hosszú-távú depresszió (LTD)</i>	17
<i>Az időzítésfüggő szinaptikus plaszticitás</i>	18
A lassú inward áramok	20
Hypothalamus	22
<i>A táplálék- felvétel és a nucleus arcuatus</i>	23
<i>Az astaxanthin</i>	25
Célkitűzések	28
Anyagok és módszerek	29
Oldatok és vegyszerek	29
Humán minták	29
Állatok	30
A minták preparálása	32
Elektrofiziológia	32
Kalcium-imaging	35
Morfológiai és immunhisztokémiai vizsgálatok	35
Eredmények	37
A SIC-ek asztrocita- és GluN2B alegységet tartalmazó NMDAR-függő események egér mintákban	37
Humán mintákban a SIC-ek asztrocita- és GluN2B alegységet tartalmazó NMDAR-függő események	40
A humán és egér SIC összehasonlítása	44
A SIC-ek elektromos szignálként működnek az időzítésfüggő szinaptikus plaszticitás (STDP) kiváltásakor	45

A SIC-ek hatása a szinaptikus plaszticitásra humán mintákban.....	50
Az egér és humán SIC-ek öregedése és azok hatása a szinaptikus plaszticitásra.....	51
Az astaxanthin hypothalamusra gyakorolt hatása hosszútávú bevitel esetén.....	58
Az astaxanthin akut hatása a hypothalamus neuronjain	60
Megbeszélés.....	65
A humán és egér SIC-ek különböznek	65
A SIC-ek szinaptikus erősséget befolyásoló képessége	66
Az öregedés befolyásolja a SIC-eket és a szinaptikus erősség SIC-függő változásait....	69
A SIC-ek és különböző patológiai kórképek	72
Az astaxanthin hatása a hypothalamus neuronjaira	73
Összefoglalás	75
Summary.....	76
Irodalomjegyzék	77
Tárgyszavak.....	101
Köszönetnyilvánítás	102
Függelék	103

Rövidítések

aCSF – arteficiális cerebrospinális folyadék

AgRP - Agouti-related protein

AMPA - 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)propánsav

ARC – nucleus arcuatus

ASX – astaxanthin

ATP - adenzin-trifoszfát

A β ₁₋₄₂ - amiloid β 1-42

CaMK-II - Ca²⁺/calmodulin-függő protein kináz II

CART – kokain és amfetamin-kapcsolt transzkriptum

CB1R – endocannabinoid receptor 1

ChR2 - channelrhodopsin 2

CNO - clozapin-N-oxid

EAAT - excitatórikus aminosav transzporter

eCB - endocannabinoidok

EPSC – excitatórikus posztzinaptikus áram

GAD2 – 2-es típusú glutamátdekarboxiláz

GFAP - gliafibrilláris savas fehérje

HFS – nagy frekvenciás stimulálás

IP3 - Inozitol-1,4,5-triszfoszfát

JAK2 – Janus kináz 2

KATP csatorna – ATP-érzékeny kálium csatorna

L-AA - L- α -aminoadipát

L-AP4 - L-2-amino-4-foszfonovajsav

L-CCG-I - (2*S*,19*S*,29*S*)-2-(karboxiciklopropil) glicin

LFS - alacsony frekvenciás stimulálás

LTD – hosszú távú depresszió

LTP – hosszú távú potencírozás

MAPK – mitogén-aktivált protein kináz

MFI – átlagos fluoreszcencia-intenzitás

mGluR – metabotróp glutamát receptor

NMDA - N-metil-D-aszparaginsav

NMDAR - N-metil-D-aszparaginsav receptor

NPY – neuropeptid Y

PAR1 – proteáz-asszociált receptor 1

PGE2 – prosztaglandin E2

PI3K - foszfoinozítid 3-kináz

PIP2 - foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát

PIP3 - foszfatidil-inozitol-3,4,5-trifoszfát

PKC – proteinkináz-C

PLC – foszfolipáz-C

POMC – proopiomelanokortin

PP1 – protein foszfatáz 1

ROI - vizsgált terület – region of interest

SIC – lassú inward áramok (slow inward currents)

STDP – spike timing- dependent plasticity

TBS – theta-burst stimulálás

TBS - Tris pufferezt sóoldat

t-LTD – időzítésfüggő LTD

t-LTP – időzítésfüggő LTP

TNF α - tumor nekrotikus faktor α

VGAT2 – 2-es típusú vezikuláris gamma-amino-vajsav transzporter

VGCC – feszültségfüggő Ca²⁺ csatorna

VGLUT - vezikulásir glutamát transzporter

Bevezetés

A lassú inward áramok (slow inward currents - SIC) már néhány évtizede ismert jelenségek az agy több területén is. Előző kísérleteinkben már mi is igazoltuk jelenlétét a nucleus pedunculopontinusban, de kimutatták már hippocampusban, thalamusban, nucleus accumbensben, bulbus olfactoriusban, vizuális cortexben és a gerincvelőben. A SIC-ek funkcióját és fiziológiai jelentőségét ennek ellenére még nem ismerjük. Egyes elméletek szerint egy asztrocita doménon belül összehangolja a neuronok működését. Ez viszont a saját eredményeink alapján nem valószínű, mivel a hippocampusban és a nucleus accumbensben talált eredményekkel ellentétben az agytörzsben nem találtunk erre bizonyítékot. Az epilepszia-modellekben is megjelennek a SIC-ek, a magnézium mentes környezet megnöveli ezen áramok frekvenciáját, de a SIC-ek gátlásával az epilepszia nem gátolható. Modellezési és kísérleti kutatások is felvetették annak a lehetőségét, hogy a SIC-eknek neuromodulációs hatásaik vannak. Az NMDA receptorok, valamint az asztrociták nagymértékben befolyásolják a hosszútávú potenciózást (LTP), depressziót (LTD) és az időzítésfüggő 'spike timing dependent plasticity'-t (STDP). Annak fényében, hogy a SIC-ek kialakulásában kulcs szerepet játszik az asztrociták által felszabadított glutamát és a neuronális, GluN2B alegységet tartalmazó extraszinaptikus NMDA receptorok, érdemesnek tartottuk megvizsgálni annak a lehetőségét, hogy a SIC-ek hatással lehetnek a szinaptikus plaszticitásra egér és humán mintákban egyaránt. Ezek mellett vizsgáltuk, hogy az öregedés hogyan hat a SIC-ekre és illetve az általuk befolyásolt folyamatokra.

Az astaxanthin lipofil szerkezete lehetővé teszi, hogy átdiffundáljon a sejtmembránon, vagy akár a vér-agy gáton. Rengeteg pozitív hatását bizonyították már, többek között rendkívül erős antioxidáns szer, gyulladáscsökkentő, immunstimuláló, és neuroprotektív. Jótékony hatással van a tanulásra, a memóriára. Neurodegeneratív kórképekben, Alzheimer és Parkinson-kórban is vizsgálják az astaxanthin hatásait. Az utóbbi években antidiabetikus és diétás hatásait is elkezdték vizsgálni. Mivel az astaxanthin étrendkiegészítőként forgalomban van az USA-ban, Japánban és az Európai Unióban, szeretnénk volna megvizsgálni a hypothalamus étvágyat irányító központjára, a nucleus arcuatusra gyakorolt hatását.

Irodalmi áttekintés

Az asztrociták

Habár a neuronokat már évszázadok óta ismerték és kutatták, Cajal volt az első, aki elsőként tulajdonított az asztrocitáknak nagyobb jelentőséget, mint egyszerű térkitöltők: „Az a feltételezés, hogy a neuroglia rostjai közötti kapcsolat és a neuronsejtek közötti kapcsolat hasonló a kötőszövet és az izom- vagy mirigysejtek közötti kapcsolathoz, vagyis passzív szövet, pusztán töltőanyag és támaszték (a legjobb esetben is a tápláló nedvek felvételét segítő szövet), jelenti a legfőbb akadályt, amitől a kutatónak meg kell szabadulni ahhoz, hogy racionális elképzelést kapjon a neuroglia tevékenységéről” (1)

Az asztrociták a központi idegrendszer egy kis részét hálózák be nyúlványaikkal és tartják ellenőrzésük alatt. Ezt a területet asztrocita doménnek nevezzük. Egy asztrocita nyúlványai egy térhálós, háromdimenziós funkcionális szerkezetet hoznak létre, amik nem fednek át más asztrociták doménjével. Minden domén megközelítőleg 300-600 dendritet, és 10^5 szinapszist foglal magába (2,3). Humán asztrociták esetében ezen számok nagyságrendekkel nagyobbak lehetnek (4). Az asztrociták nem csak érintkeznek a szinapszisokkal, hanem konkrét hatással lehet a szinapszisok számára is (5). Az asztrociták egymás között és más gliasejtekkel gap junction-ön keresztül kommunikálnak, ezáltal hálózatot létrehozva, amit egyfajta asztrocita „szincíciumnak” is tekinthetünk (6).

Ugyan elektromosan nem ingerelhető sejtek, mint a neuronok, de számos agyi folyamatban részt vesznek, mint a neuronok metabolikus támogatása, a neuronok túlélésének, és differenciálódásának segítése és a szinaptogenezis, ion-, és vízhomeosztázis fenntartása, a neurotranszmitterek termelése és eltávolítása, valamint lebontása és a vér-agy gát kialakítása. Részt vesznek továbbá a különféle agyi funkciókban, ide értve a tanulást, memóriát, alvást és ébrenlétet, és a neuroendokrin szabályozást (7–9).

Attól függetlenül, hogy nem-excitábilis sejtek, az asztrociták membránjában elhelyezkednek feszültség-, és ligandfüggő csatornák egyaránt (10). Bizonyos értelemben az asztrocitákat mégis tekinthetjük excitábilis sejteknek; míg a neuronoknál a membrán elektromos változásairól beszélünk, addig az asztrocitáknál az intracelluláris kalcium koncentrációjában történhetnek hatalmas változások (11). Az intracelluláris kalcium pillanatnyi megemelkedésével az asztrociták kalcium hullámokkal vagy oszcillációval kommunikálnak a környező sejtekkel (12). Ez a fajta „ Ca^{2+} excitábilis” létrejöhet valamilyen eseményre válaszul, mint a neuronok neurotranszmitter kibocsátása, vagy akár

spontán is (13). Humán hippocampus és corticalis mintákban szintén megfigyelhetők az asztrociták spontán és ingerlésre válaszul adott kalciumjel (14). A kalcium hullámhoz szükséges kalcium nem csak az extracelluláris térből áramlik be a sejtekbe, hanem főleg a belső raktárakból szabadul fel. Az asztrociták membránjában sok G-protein kapcsolt neurotransmitter receptor helyezkedik el, amik a ligandot kötve aktiválják a foszfolipáz C-t és az inozitol-1,4,5-triszfoszfát képződését, ami az IP₃ receptorokkal rendelkező Ca²⁺ raktárakból kalciumot szabadít fel, ezzel megnövelve az intracelluláris koncentrációját (15) (16). A kalciumjel nem csak intracellulárisan, de intercellulárisan is jelként szolgálhat a sejtek között, azaz a kalciumjel tovább terjedhet egyik sejtről a másikra (17).

Az asztrociták nem csak reagálnak a környezetükben történetekre, hanem aktív szereplői a központi idegrendszernek. Az asztrociták kalciumjel-függő módon képesek neuroaktív anyagokat kibocsátani, amit gliotranszmisszióknak nevezünk. Ezen neuroaktív anyagok közé tartozik a glutamát, ATP, D-szerin, és a tumor nekrozis faktor α (TNF α) (18–22).

Az asztrociták és a kalcium

Az asztrociták nyúlványai a pre- és posztzinaptikus sejtet egyaránt körbeölelik, szoros kapcsolatot kialakítva a három sejt között (23,24), ez pedig lehetőséget biztosít számos interakcióra a sejtek között. Neuron-asztrocita kokultúrában a neuronok szinaptikus aktivitásával szinkronban az asztrocitákban Ca²⁺ hullámokat tapasztaltak (25), és hasonlókat találtak patkány hippocampusban is (26), ami arra engedett következtetni, hogy az asztrociták valamiképpen részt vesznek a szinaptikus aktivitásban. Az idegrost ingerlésének hatására az asztrocitákban kalciumjelek keletkeztek. Ezt a kalciumjelet glutamát-transzporter gátlószerével nem lehetett blokkolni, viszont az acetilkolin receptorok gátlásával a kalciumjel is eltűnt. Másrészt acetilkolin hatására aktiválódtak az asztrociták glutamát transzporterei is (15). Az asztrociták kifejeznek a membránjukban ionotróp és metabotróp glutamát receptorokat egyaránt, amelyek aktiválása az ic. Ca²⁺ koncentrációjának megnövekedésével jár. Az ionotróp receptorok közül a 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)propánsav (AMPA) és az N-metil-D-aszparaginsav (NMDA) (27), míg a metabotróp receptorok körül a mGluR5 altípus a leggyakoribb, ami az IP₃ útvonalon keresztül szabadít fel kalciumot (28).

Sejtenyészetben, élő szöveten, sőt *in vivo* az asztrocitákat mechanikusan vagy elektromosan stimulálva a Ca²⁺ hullám nem csak egyetlen asztrocitán jelenik meg, hanem ez a hullám végigterjedhet akár több száz sejten kb. 5-20 μ m/s sebességgel (29–31).

Különbéféle szenzoros stimulációt használó kísérletekben *in vivo* kalcium oszcillációkat mutattak ki, amik a neuronális aktivitás következtében jöttek létre; nem altatott, szabadon mozgó állatokban is megfigyelték, hogy futás közben hatalmas, ismétlődő kalciumjeleket adnak le az asztrociták, és akár egymástól 100 μm -re lévő sejtek is aktiválódtak (32–34).

Kalcium hullámok viszont nem csak stimulálásra, vagy valamilyen szinaptikus eseményre válaszul jöhetnek létre, hanem spontán is előfordulnak (35). Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció ilyenkor a nyugalmi 50-250 nmol/l-ről akár 1-2 $\mu\text{mol/l}$ -ig is emelkedhet és ez a változás akár 10 másodpercig is tarthat. Ezek a hullámok egy-egy sejtben elkülönülve is előfordulhatnak, de leggyakrabban szinkronizálva történnek (36,37). Schummers és mtsai ezt úgy magyarázták, hogy nem a Ca^{2+} válaszok terjednek az asztrocitákon a gap junction-kön keresztül, hanem a neuronok körül lévő asztrociták válaszolnak a neuronok aktivitására önállóan, de összhangban (38).

Az asztrociták és a glutamát

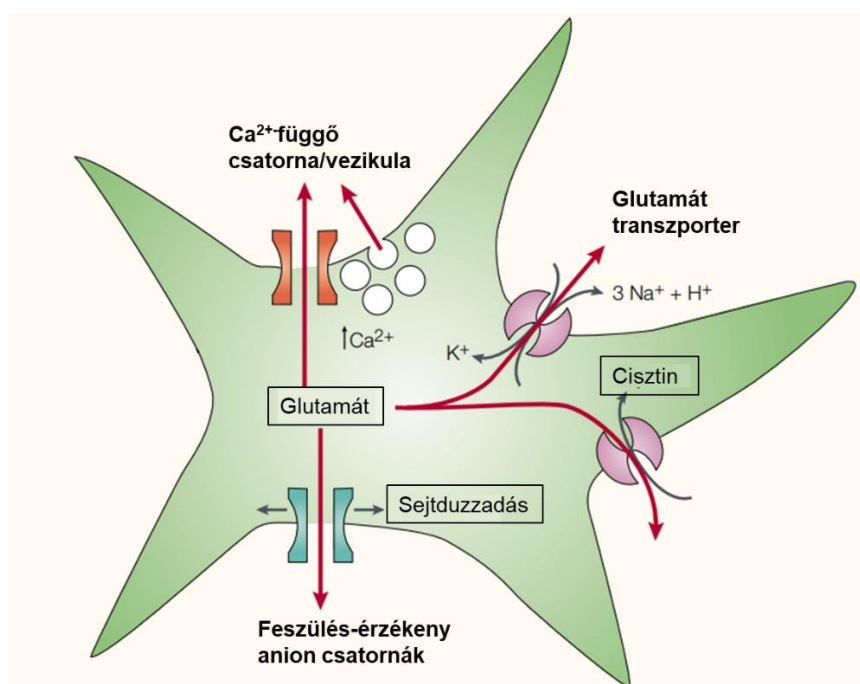
A glutamát nagy szerepet játszik az asztrociták esetében. Nem csak a neuronok által kibocsátott glutamát felvételét és újrahasznosítását biztosítják (39), de maguk is képesek gliotranszmitterként glutamátot felszabadítani (40,41).

Az asztrociták egyik fő feladata, hogy a szinaptikus résből kidiffundálódó glutamátot az extracelluláris térből transzportereken keresztül eltávolítsa. Ehhez specifikus glutamát transzportereket fejeznek ki a plazmamembránjukon. Az öt altípus közül a legnagyobb jelentőséggel az 1-es típusú excitatórikus aminosav transzporter (excitatory amino acid transporter1- EAAT1 vagy más néven L-glutamát/L-aszpartát transzporter) és a 2-es típusú excitatórikus aminosav transzporter (EAAT2) rendelkezik (42). Ezek arra hivatottak, hogy megakadályozzák a glutamát receptorok túl hosszú aktivációját és a glutamát felhalmozódását, ezáltal megvédve a neuronokat a citotoxikus sejthaláltól (43). A transzporterek azáltal is segítenek, hogy a neurotranszmitterek szinaptikus szóródását szabályozzák (44). Meghatározzák, hogy mennyi glutamát jusson el az extraszinaptikus receptorokhoz (45), valamint befolyással vannak a posztszinaptikus aktivitás időtartamára és intenzitására is (46).

A transzporter egy glutamátot juttat az intracelluláris térbe egy nátrium és egy hidrogénion mellett, és ezzel szemben egy káliumiont juttat ki az extracelluláris térbe (47,48). A felvétel után a glutamátot a glutamin szintetáz átalakítja és az így keletkezett glutamin először az extracelluláris térbe jut, majd egy neuron felvéve azt ismét glutamáttá alakítva újra

használhatja. Másik lehetőségként a glutamint az asztrociták metabolizálhatják saját hasznosításra (49,50).

A neuronális glutamát hatására az asztrocitákban a kalcium intracelluláris koncentrációja megnőtt (15). A kalciumjelre pedig az asztrocita maga is felszabadíthat glutamátot (19,51) vezikulák révén (18,52), fordított transzporttal a glutamát transzporterén keresztül (53,54), sejtduzzadás következtében anioncsatornák megnyílásával (55,56), purinerg receptoron (57) vagy hemichannel-eken keresztül (58), és cisztin-glutamát antiporter segítségével (59,60) (1. ábra).



1. ábra A glutamát-transzport lehetséges mechanizmusai A asztrocitákból a glutamát-felszabadítás több mechanizmus segítségével történhet. Az intracelluláris Ca^{2+} megnövekedésének köszönhetően a glutamátot tartalmazó vezikulák felszabadulnak, ezáltal az extracelluláris térbe juttatva a glutamátot. Másik lehetőségként a glutamát transzportereken keresztül pumpálja ki a sejt a glutamátot. Ennek egyik formája, amikor fordított transzport történik és a glutamáttal együtt Na^+ és H^+ ionok hagyják el a sejtet és egy K^+ megy be a sejtbe. A másik mód, a cisztin-glutamát antiporter. A sejtek duzzanata esetén a feszülés-érzékeny anion csatornák nyílásával jelentős mennyiségű glutamát is távozhat a sejtől (61).

A leggyakoribb glutamát felszabadítási forma mégis a vezikulák útján történik. A glutamátot vezikuláris glutamát transzporterek (VGLUT) segítségével juttatja be a sejt a vezikula belsejébe a H^+ koncentráció gradiensét felhasználva (V-ATPáz). Az asztrocitákban a VGLUT mindhárom izoformája (VGLUT 1, 2 és 3) megtalálható (62,63). Gátolva a VGLUT-ot vagy a V-ATPáz-t, a glutamát felszabadulást mérsékelhetjük (63,64). A vezikula felszabadulásáért felelős szinaptobrevin 2, a szinaptoszóma-asszociált fehérje 23 kDa-os izoformája (SNAP-23), a szintaxin, és a SNARE komplex, valamint a Ca^{2+} szenzorként

működő szinaptotagmin 4 is megtalálható az asztrocitákban (65–67), amik segítségével a vezikula vagy csak egy kis részen fuzionál a membránnal és azon keresztül engedi ki a glutamátot, vagy pedig teljesen beleolvad a plazmamembránba (18,62,68).

Glutamát receptorok

Míg a glutamát koncentrációja a vezikulákon belül majdnem eléri a mol/l-es koncentrációt (~0.1 mol/l) addig ez a szinaptikus részbe diffundálva már csak 6-7 mmol/l. Ez az extracelluláris térben tovább diffundálva kb. 0,18-2,12 $\mu\text{mol/l}$ -re (mérési módszertől függően nmol/l és $\mu\text{mol/l}$ -es koncentráció között) csökkenti a glutamát koncentrációját (69) (70).

Az NMDA receptorok

Az NMDA receptorok ligandvezérelt, heteromer ioncsatornák, amiket a glutamát, és koaktivátorként a D-szerin és a glicin képes aktiválni. A ligand kötődése után a csatorna permeábilissé válik nátriumra, káliumra és kalciumra. Fiziológias körülmények között, önmagában a ligand kötődése nem hoz létre ionáramot, szükség van a membrán depolarizálódásához is (71). Az NMDA receptorok mindegyikét eltorlaszolja egy Mg^{2+} és a csatorna átjárhatóságának egyik feltétele, hogy ez a gátlás megszűnjön (72,73). A receptor a magnézium gátlás alól depolarizáció hatására szabadul fel, aminek hatására szabad utat enged a nátriumnak, káliumnak és kalciumnak (74). Az évek alatt több hipotézis is napvilágot látott, azzal kapcsolatban, hogy pontosan milyen mechanizmus állhat a Mg^{2+} gátlás megszűnése mögött. Ezek közül az egyik, hogy a glutamát mellett D-szerin is felszabadul, ami az NMDA receptor glicin kötőhelyéhez kötődik és azon keresztül aktiválja a receptort, ezáltal segítve a csatorna megnyílását (75). Egy másik elmélet szerint az asztrocitákból felszabaduló ATP nyomán depolarizálódik a membrán (76). Az asztrocitákból felszabaduló glutamát viszont nem csak az NMDA receptorokat képes aktiválni, hanem a metabotróp receptorokat is. Az mGluR1 aktiválódása szintén depolarizációt okozhat (51).

A heteromer csatornákat GluN1, GluN2A-D, GluN3A-B alegységek alkotják (régii nevezéktan szerint NR1, NR2 és NR3), di- vagy triheteromer formációban. A csatornák felépítésében mindig részt vesz egy GluN1 alegység, ami elengedhetetlen a csatorna működéséhez (77). A GluN2A alegység jellemzően a szinapszisokban lévő NMDA receptorok egyik összetevője, míg a GluN2B leginkább extraszinaptikusan helyezkedik el. Ez azonban nem törvényszerű, mivel a GluN2B alegységek előfordulnak a szinapszisokban is (78,79). A GluN2C és GluN3A általánosan előforduló alegység a központi

idegrendszerben, szinaptikusan és extraszinaptikusan egyaránt megjelenik. A GluN2D kizárólag extraszinaptikus alegység (80). Ez viszont nem szabályszerű, hiszen az extraszinaptikus és szinaptikus NMDA receptorok között szabad átjárás lehet (81). Az NMDA receptorok nem egyenletesen helyezkednek el a membránban, hanem klaszterekben tömörülnek. Ezek a dendritek mentén és a periszinaptikus régiókban helyezkednek el (82). Az NMDAR-ok nem csak ioncsatornaként, hanem metabotróp receptorként is működhetnek (83).

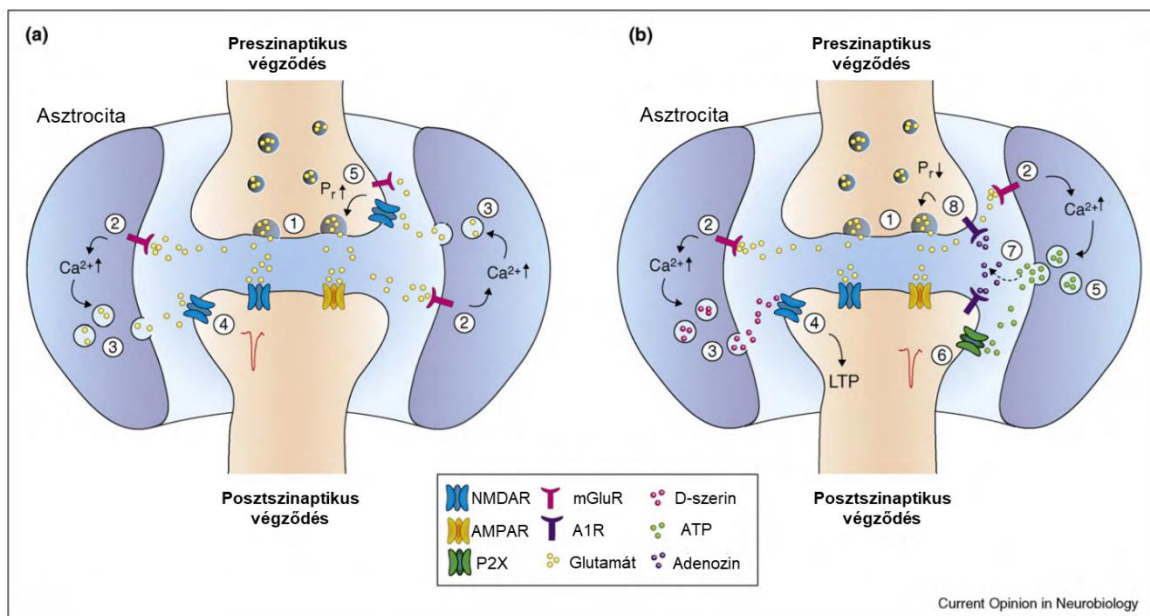
Az NMDA receptorokról leírták már, hogy feszüléssérzékenyek és ezen tulajdonságát a GluN2B alegységnek köszönheti. Ugyanennek az alegységnek a megléte miatt lassabbak az extraszinaptikus receptorok a szinaptikus NMDA receptorokhoz képest, viszont a glutamát affinitásuk nagyobb (84). A GluN2B expressziója az első posztnatális héten meghaladja a GluN2A szintjét, de ez az arány az idő előrehaladtával megfordul (85). Ezt jól mutatja az is, hogy a corticalis és hippocampalis szinapszisokban és a vizuális cortexben lévő NMDA receptorok GluN2B specifikus ifenprodil érzékenysége az életkor előrehaladtával csökken, vagyis a GluN2A veszi át a helyét, mint fő alegység (79,86,87). Ehhez a változáshoz viszont nem csak az NMDA receptorok aktivitására van szükség, hanem a mGluR5-re is, ami a foszfolipáz-C (PLC) útvonalának aktiválásán keresztül a proteinkináz-C-t (PKC) aktiválva hat erre a mechanizmusra (88).

Az extraszinaptikus NMDAR aktiválódását az a glutamát okozza, ami a szinaptikus részből elszabadulva tovább diffundál (89). A másik aktiválási lehetőség az asztrocitákból vagy mikrogliaókból gliotranszmitterként felszabaduló glutamát, esetleg az a glutamát, amit sem a neuronok, sem az asztrociták nem vettek fel, így szöveti (vagyis extraszinaptikus) glutamátként jelen van az extracelluláris térben (90).

Metabotróp glutamát receptorok

A metabotróp glutamát receptoroknak három csoportját különböztetjük meg. A mGluRI alcsoportba tartozik a mGluR1 és mGluR5, és peri-, valamint extraszinaptikusan helyezkednek el. Ezek G_q proteinhez kapcsolt receptorok, amik a foszfoinozitol -biszfoszfát útvonalat aktiválják (91,92), és érzékenyek a kviszkálsavra (93). A II. csoportba tartozik az mGluR2 és mGluR3, de ezen receptorok inkább extraszinaptikusan helyezkednek el, bár kimutatták már őket periszinaptikusan is (91,94). A III-as csoport tagjai (mGluR4, 6, 7, 8) a periszinaptikus régióban, G_i -fehérjékhez kapcsoltan csökkentik az adenilát-cikláz mennyiségét (91,95,96). A mGluR III-as csoport tagjainak a glutamátnál nagyobb affinitása

van a (2S,19S,29S)-2-(karboxiciklopropil) glicinhez (L-CCG-I) (97) és az L-2-amino-4-foszfonovajsavhoz (L-AP4) (98). Az asztrociták szabályozhatják az mGluR-okon keresztül a szinaptikus transzmissziót. Az asztrocitákból felszabaduló glutamát aktiválja az mGluR-okat, aminek következtében csökken a szinaptikus transzmisszió, ezáltal csökkennek a serkentő és gátló szinaptikus áramok (99,100) (2. ábra). Erre egy példát hozva: A hippocampus CA1-es régiójának piramis sejtjeiben a spontán excitatorikus posztzinaptikus áramok (EPSC) frekvenciája megnőtt, azáltal, hogy az asztrocitákból származó glutamát aktiválta a mGluRI-et és ezzel a preszinaptikus sejtől könnyebben felszabadulhatott a glutamát (101). Ezeket az eredményeket később megerősítették: az asztrociták spontán glutamát felszabadítása hozzájárul a vezikulák felszabadítási valószínűségének növeléséhez, és így a szinaptikus plaszticitáshoz (102).



2. ábra A háromrészes (tripartite) szinapszisok. (a) A glutamát hatása a háromrészes szinapszisokra A preszinaptikus végből felszabaduló neurotransmitter (1) nyomán az asztrocitákban megnő a Ca^{2+} szint (2) és az asztrocitákból gliotransmitterként glutamát szabadul fel, ami befolyásolhatja a pre- és a posztzinaptikus sejtet egyaránt (3). Az asztrocitákból felszabaduló glutamát az NMDA receptoron keresztül hatással lehet a posztzinaptikus sejtire, ezáltal befolyásolva a szinaptikus plaszticitást (4). A preszinaptikus sejten lévő mGluR-ok is reagálhatnak a glutamátára, aktiválódásukkal megnőhet a transzmitterek felszabadulási valószínűsége (Pr). (b) Más gliotranszmitterek hatása a háromrészes szinapszisokra A preszinaptikus sejtől felszabaduló glutamát (1) aktiválja az asztrocitákat, amikben megnő a Ca^{2+} szint (2). Ennek hatására az asztrociták D-szerint szabadítanak fel (3), amik aktiválva a posztzinaptikus sejteken lévő NMDA receptorokat (4) befolyásolják a szinaptikus plaszticitást. ATP is felszabadulhat az asztrocitákból (5), ami a purinerg P2X receptort aktiválva (6) negatív visszacsatolással csökkentheti a tüzelési frekvenciát a posztzinaptikus sejtben (szinaptikus scaling). Az ATP adenzinná alakulva (7) a preszinaptikus A1R receptort kötve (8) csökkentheti a glutamát felszabadulási valószínűségét (Pr) (46).

A szinaptikus plaszticitás

A szinapszisok aktivitásának csökkenése vagy növekedése hatással van a szinaptikus válaszok erősségére. A szinaptikus transzmisszió ezen aktivitásfüggő változásait szinaptikus plaszticitásnak nevezzük. A nemzetközi tudományos közösség a plaszticitás elmélet atyjának a kanadai származású Donald Hebb-et tartja. 1949-es munkájában így írta le először a jelenséget: „Ha az A sejt ismételtelen vagy folyamatosan részt vesz a B sejt aktiválásában, bizonyos növekedési folyamatok vagy metabolikus változások történnek az egyik vagy mindkét sejten, aminek következtében az A effektivitása a B sejt aktiválásában megnövekedik.” (103). Később az ezen elmélet alapján született kutatásokban ezt a fajta plaszticitást Hebb-féle plaszticitásnak nevezték. A szinaptikus plaszticitás klasszikus típusai a hosszú távú potencírozás (long-term potentiation- LTP) és a hosszú távú depresszió (long-term depression- LTD).

A mechanizmus időtartalmától függően 3 kategóriát különíthetünk el: a rövid távú plaszticitást, a hosszú távú plaszticitást és a homeosztatikus plaszticitást (104). A rövid távú plaszticitás az ezredmásodperctől (101) akár percig tartó változás (105), ami megnövelheti, vagy lecsökkentheti a neurotranszmitterek felszabadulásának valószínűségét (106). A hosszú távú plaszticitás a több órán át tartó változástól kezdve akár hónapokig vagy évekig is fennmaradhat (107). A homeosztatikus plaszticitás egy szinaptikus hálózatban modulálja a szinaptikus erősséget, beleértve az egy preszinaptikus és egy posztzinaptikus sejt közötti koordinációt (108,109). A rövid- és hosszú távú plaszticitás egyaránt lehet homo-, vagy heteroszínaptikus (110). A homoszinaptikus plaszticitás (másnéven input specifikus, vagy asszociatív plaszticitás) esetében szükség van a preszinaptikus sejt aktivációjára is, míg a heteroszínaptikus plaszticitás kialakulásához egy szinapszison kívüli neuron, vagy pálya aktivitásának megváltozására van szükség (111).

A hosszú távú potencírozás (LTP)

Hebb megállapításai után csak 1973-ban írták le részletesen az LTP jelenségét (112). Ebben a munkában kimutatták, hogy rövid ideig tartó, de nagy frekvenciával (~100 Hz) való stimulálás (high frequency stimulation- HFS) megnövelte a szinaptikus potenciálok amplitúdóját, altatott állatokban ez a változás órákig, szabadon mozgó társaikban viszont hónapokig, illetve a hosszú távú kísérletek végéig tartott (112). A HFS-es protokollok során a legelterjedtebb az 1 másodpercig alkalmazott 50-100 Hz-es impulzus (112,113). Hasonló eredményeket értek el az úgynevezett theta-burst stimulálással (TBS). A TBS-nál 200 ms-

onként több impulzussorozatot alkalmaztak, ahol egy sorozat 100 Hz-es volt. (114,115). Az LTP nem csak stimulálással, de kémiai úton is kiválthatóak: az mGluR-ok és NMDAR-ok aktiválása egyaránt okozhat LTP-t (116). Számos kísérlet kimutatta, hogy az asztrociták glutamát felszabadítása következtében a preszinaptikus metabotróp glutamát receptorok és a preszinaptikus NMDA receptorok aktiválása révén a neurotranszmitterek felszabadulásának valószínűsége akár órákra megnőhet (117), vagy lecsökkenhet (118). Ahhoz, hogy ilyen sokáig fennmaradjon a potencírozás, szükség van a preszinaptikus mellett posztszinaptikus és asztrocita stimulációra is (100).

Az LTP-hez több, látszólag véletlenszerű eseménynek kell bekövetkeznie: miközben a preszinaptikus és posztszinaptikus sejtek időben szinkronizálva aktiválódnak, a preszinaptikus sejt felszabadítja a glutamátot, miközben a posztszinaptikus sejt depolarizálódik, az NMDA receptorok felszabadulnak a magnézium gátlás alól és megnyílnak (74). Az NMDA receptorok aktiválódása nyomán a posztszinaptikus sejtben megnő az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációja, ami aktiválja a PKC-t (119), a Ca^{2+} /kaldmodulin-függő protein kináz II-t (CaMK-II) (120) és a mitogén-aktivált protein kinázt (MAPK) (121,122). Az aktivált kinázok foszforilálni fogják az AMPA receptorokat (123). Végeredményként további AMPA receptorok helyeződnek ki a membránba és a receptorok ion konduktanciája tartósan megnő, vagyis LTP alakul ki (124,125). Az AMPA receptorok kihelyezéséért a SNARE-proteinek lehetnek a felelősek (126). Az NMDA receptorok részleges és teljes gátlása az LTP-t teljesen megszüntette, vagyis az LTP-nek elengedhetetlen része az NMDA receptorok jelenléte és aktivációja (127). Az NMDA receptorok összetétele szintén fontos az LTP kialakulásánál. Az LTP-t a GluN1, GluN2A és GluN2B alegységekből álló triheteromer, és a diheteromer GluN1/GluN2A keveréke alkotja, de többségében a triheteromerek dominálnak (128). A GluN2A és GluN2B alegységek aránya is kiemelkedően fontos: a különböző területeken, különböző arányban vesz részt ez a két alegység az LTP kifejezésében (129–133). Az életkorral ez az arány szintén változik, fiatalabb állatokban leginkább a GluN2B dominál az LTP kialakulásában (134,135). Az NMDA-függő LTP sokszor nem csak az NMDAR aktivációjától függ, hanem egyidejűleg az mGluR5-től is (136). Az mGluR-ok aktiválása elindítja a PLC-PIP2-DAG-PKC kaszkádot, aminek következtében az intracelluláris Ca^{2+} megnő (137).

A Ca^{2+} szintén elengedhetetlen az LTP-hez. Amennyiben a posztszinaptikus neuronba kalcium-keletort (EGTA vagy BAPTA) injektálunk, ezáltal megakadályozva a kalciumjel kialakulást, nem formálódik LTP (138,139).

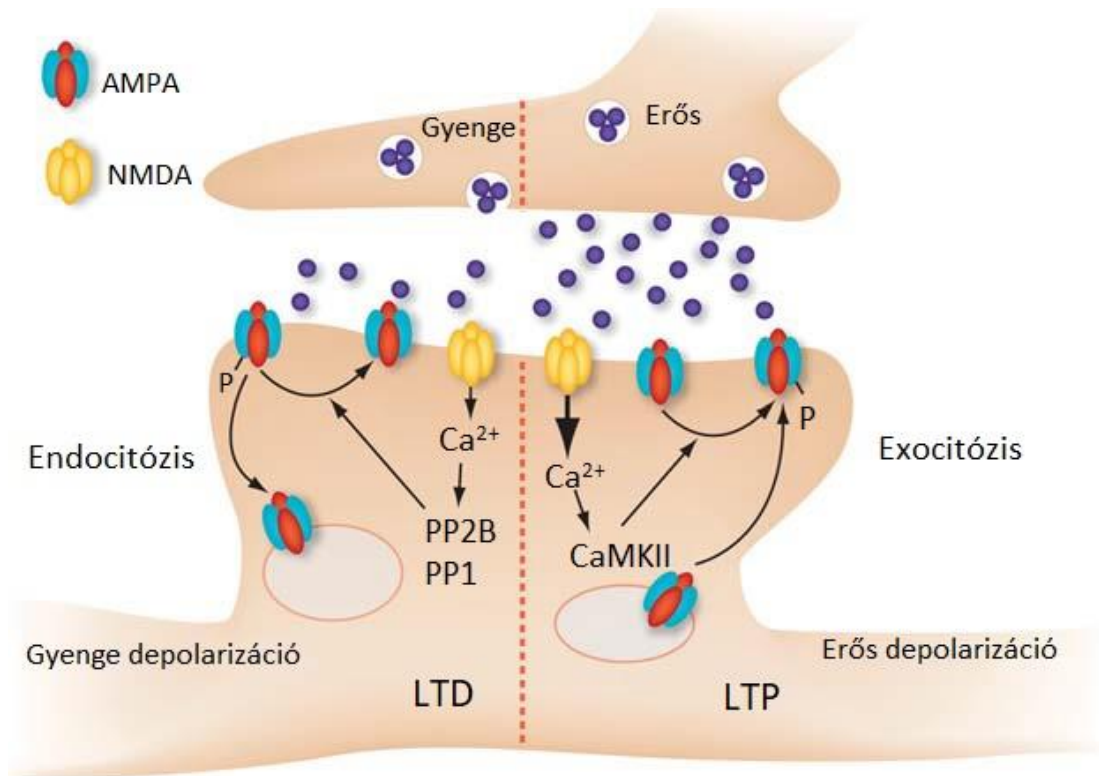
Hosszú-távú depresszió (LTD)

A hosszú távú depressziót a legtöbb kutató az alacsony frekvenciás stimulációval (LFS) váltja ki (140). A protokollok szerint 0,5 és 5 Hz közötti stimuláció 5-15 percen keresztül alkalmazása a leghatásosabb, de ezeket nagyban befolyásolja a sejt aktivitása és a szinaptikus történések (141). Ahogyan az LTP-nél, itt is lehet kémiai úton is kiváltani LTD-t. Ehhez az mGluR-ok és/vagy az NMDA receptorok aktivációjára van szükség (110,142).

Kimutatták, hogy hippocampus CA1 régiójában mechanikailag két különböző formája van az LTD-nek. Az egyik az NMDA receptorok aktivációjától függ, a másik az mGluR-októl (143). Ezzel szemben egy másik kutatócsoport ugyanabban a régióban az taláta, hogy az mGluR-ok aktivációja LTD-t váltott ki, míg ez mGluR-okkal egyidejű NMDAR aktivációja által kiváltott LTP elnyomta az LTD-t. Ebben a kísérletben LTD esetében Ca^{2+} áramlást sem tapasztaltak. Vagyis attól függ, hogy LTP vagy LTD formálódik, hogy melyik receptor aktiválódik (144). Egy másik elmélet szerint attól függ, hogy LTP vagy LTD alakul-e ki, hogy az NMDA receptorok milyen arányban nyílnak meg, és mekkora a Ca^{2+} koncentrációjának változása a posztszinaptikus sejtben. Ha a kalciumjel kicsi és elhúzó, akkor LTD alakul ki, ha nagy és tranzien, akkor LTP (110). Az LTD-nél szintén fontos az NMDA receptorok összetétele. Fiatal állatokban a GluN2B alegység dominál, de a GluN2C/GluN2D sem ritka (145,146). Ugyan a GluN2B fontos szerepet tölt be az LTD kialakulásában, de nem egyeduralkodó (147).

Ahogy az LTP kialakulásához, az LTD-nél is vizsgáltak mGluR függést. Mind a neocortexben, a hippocampusban és a cerebellumban is az mGluR I. csoportja játsza a legnagyobb szerepet az LTD kialakításában (148,149). Az asztricitákban az mGluR1 aktivációja nyomán megemelkedik a Ca^{2+} intracelluláris szintje. Ez a SNARE-n keresztül az ATP - mint gliotranszmitter – ürítéséhez vezet. Az ATP aktiválja a posztszinaptikus sejtek P2X receptorait, ami végül az AMPA receptorok a membránból való eltávolítását eredményezi (149).

Az LTD kialakulása kapcsolatban áll a PKC és PKA szubsztrátok foszforilációjával, de nem a CaMKII szubsztrátjaival (150–152). Emellett a protein foszfatáz 1 (PP1) is kapcsolódik ugyanehhez a mechanizmushoz (153). Végeredményben az LTD kialakulásakor az AMPA receptorok foszforilációi mellett azok a szinapszisokból dynamin-függő endocitózissal (clathrinnal borított vezikulák) való eltávolításuk is részt vesz (3. ábra) (154).



3. ábra Posztszinaptikus változások LTP-ben és LTD-ben. A preszinaptikus sejt kisebb aktivitása miatt a depolarizáció is kisebb lesz, ezáltal az NMDA receptorokon keresztül kevesebb Ca^{2+} áramlik a posztszinaptikus sejtbe. A foszfatázok aktiválódnak és defoszforilálják az AMPA receptorokat, amiket a sejt endocitózissal visszavesz a membránból (az ábra bal oldala). Az erős preszinaptikus aktivitás erős választ vált ki a posztszinaptikus sejtől, aminek következtében a CaMKII közvetítésével a receptorok exocitózissal kihelyeződnek a membrán felszínére (az ábra jobb oldala) (74).

Az időzítésfüggő szinaptikus plaszticitás

Az időzítésfüggő szinaptikus plaszticitás (spike timing-dependent plasticity-STDP) a hosszútávú Hebb-féle plaszticitás része, ahol kulcsszerepet kap az időzítés. McNaughton és mtsai az 1978-ban megjelent kutatásukban valószínűleg elsőként ismerték fel, hogy a pre- és posztszinaptikus akciós potenciálok (spikes- tüskék) időzítése és sorrendje egymáshoz képest befolyásolhatja a szinaptikus plaszticitást (155). Itt a HFS és a posztszinaptikus tüske közötti időintervallumot még 25 milliszekundumban határozták meg, de pár évvel később Baranyi és Fehér már ugyanezt 100 milliszekundumban mérte (156).

A Hebb-féle klasszikus STDP-ben, ha a posztszinaptikus tüskét kb. 0-20 ms-al megelőzi a preszinaptikus aktivitás, akkor LTP alakul ki. Ha a posztszinaptikus tüske jön először, és utána a preszinaptikus, nagyjából 0 és 20-100 ms között, akkor LTD alakul ki. Ez igen elterjedt, többek között a neocortexben és a hippocampusban is (157,158). Az STDP esetében a hippocampusban ugyanazok a jelátviteli útvonalak felelősek az LTP-ért és az

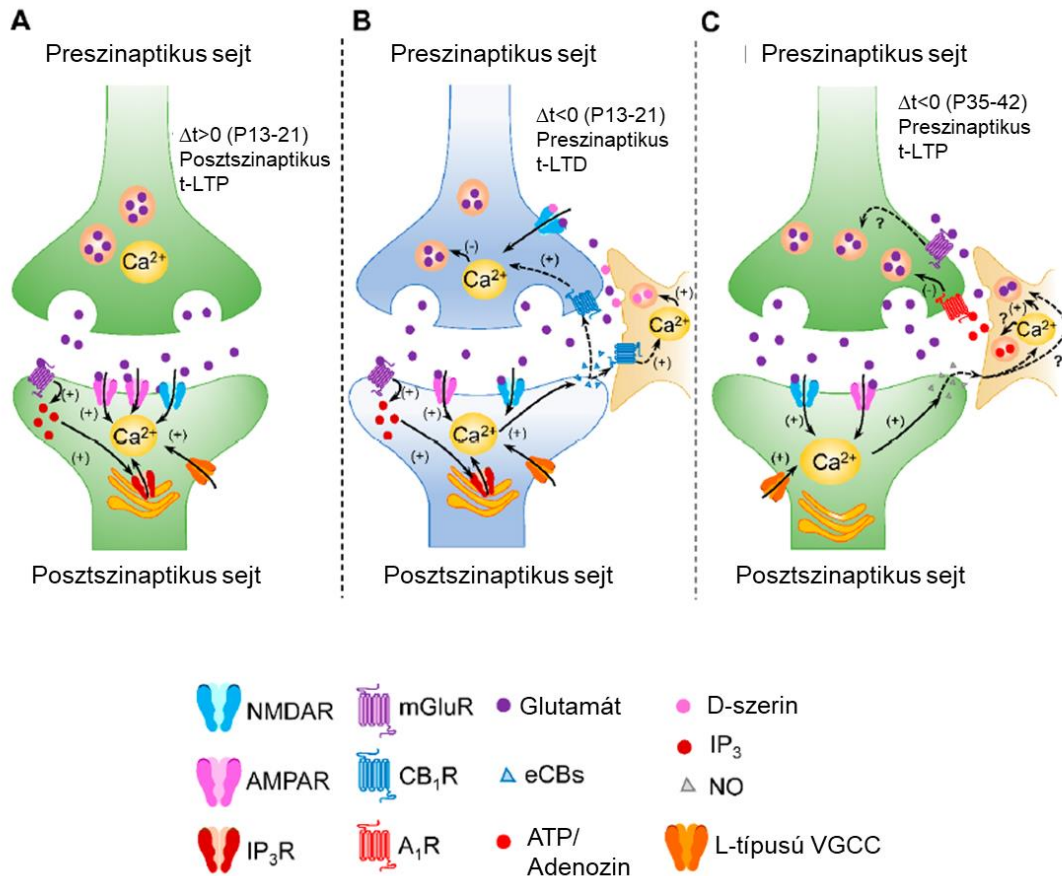
LTD-ért. Az LTP és LTD esetében is NMDA-függő jelenségről beszélhetünk, azon belül is a GluN2B alegységet tartalmazó NMDA receptorokról (159). A corticalis sejtekben a pre- és posztszinaptikus oldalon blokkolt NMDA receptorok alapján az időzítésfüggő LTP-hez (t-LTP) a posztszinaptikus NMDA receptorok szükségesek, míg az időzítésfüggő LTD-hez (t-LTD) a preszinaptikusak (160).

A preszinaptikus sejtől felszabaduló transzmitterek aktiválják a posztszinaptikus sejt NMDA receptorait, ami megnyílik és Ca^{2+} áramlik a sejtbe (161,162). Az, hogy LTP vagy LTD alakul-e ki, a klasszikus formához hasonlóan a beáramlott Ca^{2+} mennyisége fogja meghatározni (163). A másik lehetőség az NMDA receptorok mellett az mGluR- függő LTD. Itt is a mGluR-ok 1. csoportja a résztvevő, amik a PLC és az endokannabinoidok közvetítésével van hatással a preszinaptikus transzmitter felszabadításra és a posztszinaptikus Ca^{2+} beáramlásra (164) (4.ábra).

Az STDP nem hangolja össze a neuronokat, hanem egy kiegyensúlyozott, mégis irreguláris tüzelési állapothoz vezet, ahol a pre- és posztszinaptikus akciós potenciálok ok-okozati összefüggésben vannak (165). A pre- és posztszinaptikus aktivitások és azok időzítésének detektálásában fontos szerepet játszik a tüskék koincidencia kódolása. Klasszikusan az úgynevezett koincidencia detektoraként a posztszinaptikus NMDA receptorokat tekintjük (157,166), de az mGluR-ok szintén jól működnek detektorként (167). Ezen a logika mentén tovább haladva az mGluR-feszültségfüggő Ca^{2+} -csatorna (VGCC)-IP3 útvonal is kitűnő koincidencia detektor, ahogy a PLC és az IP3 receptorok is (157,168).

Az STDP az életkorral változhat. Míg fiatal rágcsálókban a t-LTD az első és második posztnatális héten jelen volt, felnőttkorra eltűnt, ellentétben a t-LTP-vel (169). Emellett fiatal állatokban még Hebb-féle t-LTD van jelen, felnőttkorra ez már anti-Hebb-féle t-LTD-vé alakul (170). Fiatal felnőtt (21-38 éves) emberekben is bizonyították mind a Hebb-féle, mind az anti-Hebb-féle STDP meglétét (171).

Humán, 20-66 éves korú páciensekből gyűjtött műtéti hippocampus mintákban is megfigyelték már az STDP-t. Ellentétben a fent leírt, rágcsálóra vonatkozó résszel, humán mintákban az időzítésnek nem kell szorosan 0 ms körül lennie. Ahhoz, hogy t-LTP jöjjön létre, elég volt, ha a tüskék időzítése 80 ms-on belül volt, míg az t-LTD-hez 80-130 ms közé kellett esniük az akciós potenciáloknak (172).



4. ábra Az mGluRI szerepe az STDP-ben. A koincidencia detektálásának 3 fő formája: **A**; A preszinaptikus sejtől felszabaduló glutamát aktiválja az NMDA, AMPA és mGluR receptorokat. Az NMDA és AMPA receptorokon keresztül beáramló Ca^{2+} aktiválja a feszültség függő Ca^{2+} csatornákat (VGCC) is, ami hozzájárul a kalcium jel emelkedéséhez. Az mGluR-ok aktiválódása után a belső raktárakból az IP₃ receptorokon keresztül szintén Ca^{2+} fog felszabadulni. **B**; Az asztrocitákból felszabaduló glutamát és D-szerin aktiválja a preszinaptikus NMDA receptorokat, ezzel pedig megnö az ic. Ca^{2+} szintje. A kalcium-jelre a preszinaptikus sejt felszabadítja a glutamátot a szinaptikus részbe. A glutamát aktiválja az NMDA, AMPA és mGluR receptorokat. Az ionotróp glutamát receptorokon keresztül beáramló Ca^{2+} aktiválja a VGCC-kat is, ami hozzájárul a kalcium jel emelkedéséhez. A metabotróp receptorok aktiválódása után a belső raktárakból az IP₃ receptorokon keresztül szintén Ca^{2+} fog felszabadulni. Ennek a kalcium jelnek segítségével fognak felszabadulni az endokannabinoidok (eCB), amik aktiválják az endocannabinoid receptor 1-et (CB1R) mind az asztrocitán, mind a preszinaptikus sejten. Ennek következtében mindkét sejtben megnövekedik az ic. Ca^{2+} . **C**; Az asztrocitákból felszabaduló glutamát és ATP aktiválja a preszinaptikus sejten a mGluR-okat és az adenosin receptorokat. Amikor a preszinaptikus sejt glutamátot szabadít fel, a posztzinaptikus sejtben megnyílnak az NMDA és az AMPA receptorok és a Ca^{2+} koncentrációja megemelkedik. Ennek hatására a posztzinaptikus sejtől nitrogén-monoxid (NO) szabadul fel, ami a sejtmembránon átjutva hatással van az asztrocita kalciumjelére és a glutamát felszabadítására. (169)

A lassú inward áramok

Ahogy az előző fejezetekből láthatjuk, a háromrészes szinapszisok rendkívül szerteágazó folyamatban vesznek részt és nem csak részt vehetnek, de modulálhatják is azokat. Ezért is

volt olyan kiemelkedő, amikor néhány kutató összekötötte az események ok-okozati összefüggéseit. Elsőként Alfonso Araque és mtsai írták le a lassú inward áramok jelenségét (slow inward current- SIC), és már 1998-ban megállapították, hogy a SIC-ek kialakulásához szükség van kalciumjelre az asztrocitákban, illetve az asztrocitákból felszabaduló glutamátra (99). Ebben a publikációban hippocampusból származó tenyésztett sejteket vizsgáltak, ahol elektromosan és mechanikailag is stimulálták az asztrocitákat, aminek hatására megnőtt bennük az ic. Ca^{2+} koncentráció, és a neuronon végzett patch-clamp mérésekkel lassú inward áramokat figyeltek meg, glutamát-függő módon. Felmerülhet a kérdés, hogy nem csak nagyra nőtt EPSC-eket figyeltek-e meg. A SIC egyértelműen elkülöníthető a paramétereit és eredetét tekintve az EPSC-től. A SIC-ek amplitúdója ugyan hasonlíthat az EPSC-kére, de a rise time, vagyis a felszálló szár ideje és a decay tau, vagyis a leszálló szár időállandója egyértelműen különböző, tehát egymástól tökéletesen elkülöníthetőek (51,173,174), és már ebből is arra lehet következtetni, hogy nem a szinapszisokból származó transzmitterek következményeként jönnek létre a SIC-ek (175). A SIC-ek sebességét és alakját több tényező alakíthatja ki: Az asztrociták transzmitter felszabadítása nagy valószínűséggel lassabban történik, mint a neuronoknál, valamint az asztrocita-neuron távolság nagyobb, mint a neuron-neuron szinapszisok távolsága, illetve a glutamát diffúziós együtthatója kisebb (175). Ehhez még hozzájárul, hogy a GluN2B tartalmú extraszinaptikus NMDA receptorok lassabban aktiválódnak (84).

Amíg az EPSC neuronális események következménye, addig a SIC kialakításában az asztrociták is kiveszik a részüket. Az asztrociták aktivitásának következményeként a Ca^{2+} koncentráció megemelkedik a sejtekben. Ha a kalciumjelet kelátokkal blokkoljuk az asztrocitákban, akkor SIC-eket sem figyelhetünk meg (99). Ezzel szemben, ha az asztrocitákban a Ca^{2+} koncentrációt mesterségesen, uncaging technikával felszabadítva megnövelték, akkor a SIC-ek frekvenciája megnövekedett (51). Hasonló történt, amikor mGluR5 agonistát (176), muszkarinos acetilkolin receptor agonistát (177), ATP-t (178), prosztaglandin E2-t (PGE2) (179), és optogenetikai aktivációt használtak az asztrocitákon (105), vagy ozmotikus ödémát váltottak ki (180). A neuronális szinaptikus események nem vesznek részt a SIC-ek kialakulásában, mivel az akciós potenciálokat gátolva is mérhetőek SIC-ek a neuronokon, vagyis TTX-re nem érzékenyek (99). Ebből következik, hogy a SIC-eket az asztrocita váltja ki valamilyen gliotranszmittert kibocsátva. Az asztrocita kalciumjélére SNARE-függő módon a vezikulákból felszabadul a glutamát, ami már képes a SIC-ek kiváltására (181). A neuronális oldalon a glutamát hatására az extraszinaptikus

NMDA receptorok aktiválódnak (51,182). Az NMDA receptor alegységei közül is a GluN2B alegységnek van nagy szerepe, azt szelektív antagonistával blokkolva a SIC-ek is megszűntek (51). Ahogy már említettem az NMDA receptorok fejezetben, az NMDAR-ok Mg^{2+} gátlás alatt állnak. Ahhoz, hogy az asztrociták által kibocsátott glutamát képes legyen aktiválni a receptorokat, a Mg^{2+} -gátlásnak meg kell szűnnie. Ha az arteficiális cerebrospinalis folyadékból (aCSF) kihagyjuk a magnéziumot, a SIC-ek frekvenciája megnő (183,184). Amennyiben Mg^{2+} -ot adunk az oldathoz, a SIC-ek frekvenciája drasztikusan lecsökken, viszont nem tűnik el teljesen. A SIC-ek fiziológias körülmények között is megjelennek, csak sokkal kisebb frekvenciával (~0.16 SICs/perc) (51).

A SIC-eket már több agyterületen is megfigyelték, úgy mint hippocampus (51,175,182), thalamus (185), nucleus accumbens (176), bulbus olfactorius (186), visualis cortex (105,177), gerincvelő (179), a nucleus medialis corporis trapezoidei (174), és a nucleus pedunculo pontinus (183). Habár a SIC-eket széleskörűen vizsgálták és találtak bizonyítékot a meglétére, fiziológias szerepét még a mai napig is homály fedi. Egyes elméletek szerint egy asztrocita doménon belül szinkronizálják a neuronokat (51,176,182), de ez nem egyetemes, mivel egyes agyterületeken ez nem következik be, például az agytörzsben (174,183). Mivel az epilepszia vizsgálatok az asztrociták Ca^{2+} -oszcillációi és ennek következtében a SIC frekvenciája is megnövekedett, úgy gondolták, hogy az epilepszia kialakulásának hátterében a SIC-ek állnak (187). Ezen elmélettel ellentétben Fellin és mtsai azt találták, hogy az asztrociták glutamát felszabadítása és a SIC-ek nem vesznek részt az epileptikus folyamatok kialakulásában (188). Az évek során felmerült az is, hogy a GluN2B tartalmú NMDA receptorok aktiválásával sejthalált generáló folyamatokat is elindíthat (175). Modellezési és kísérleti kutatások felvetették annak lehetőségét, hogy talán az LTP vagy STDP modulálásában van szerepe (102,189,190).

Összefoglalva tehát a lassú inward áramok fázisos depolarizáló áramok, aminek kialakulásáért az asztrociták glutamát felszabadítása és az extraszinaptikus NMDA áramok a felelősek.

Hypothalamus

A hypothalamus 3 nagy régióra bontható: parasagitalisan beszélünk elülső (anterior), középső és hátsó (posterior) hypothalamusról, míg coronalis síkban paraventricularis, medialis és lateralis régiókból épül fel (191). Ez a kis agyterület számos funkciót lát el, többek között az autonóm idegrendszer felügyeletét, endokrin szabályozást,

neuroszekréciót, szabályozza a testhőmérsékletet, a táplálék- és vízfelvételt, a cirkadián ritmust, és az érzelmek és magatartás kialakításában is fontos szerepe van (191). Mivel a hypothalamus számos maggal rendelkezik és még annál is több funkciót lát el, a könnyebb érthetőség kedvéért a továbbiakban a nucleus arcuatusra és a táplálék felvételére fogunk koncentrálni.

A táplálék- felvétel és a nucleus arcuatus

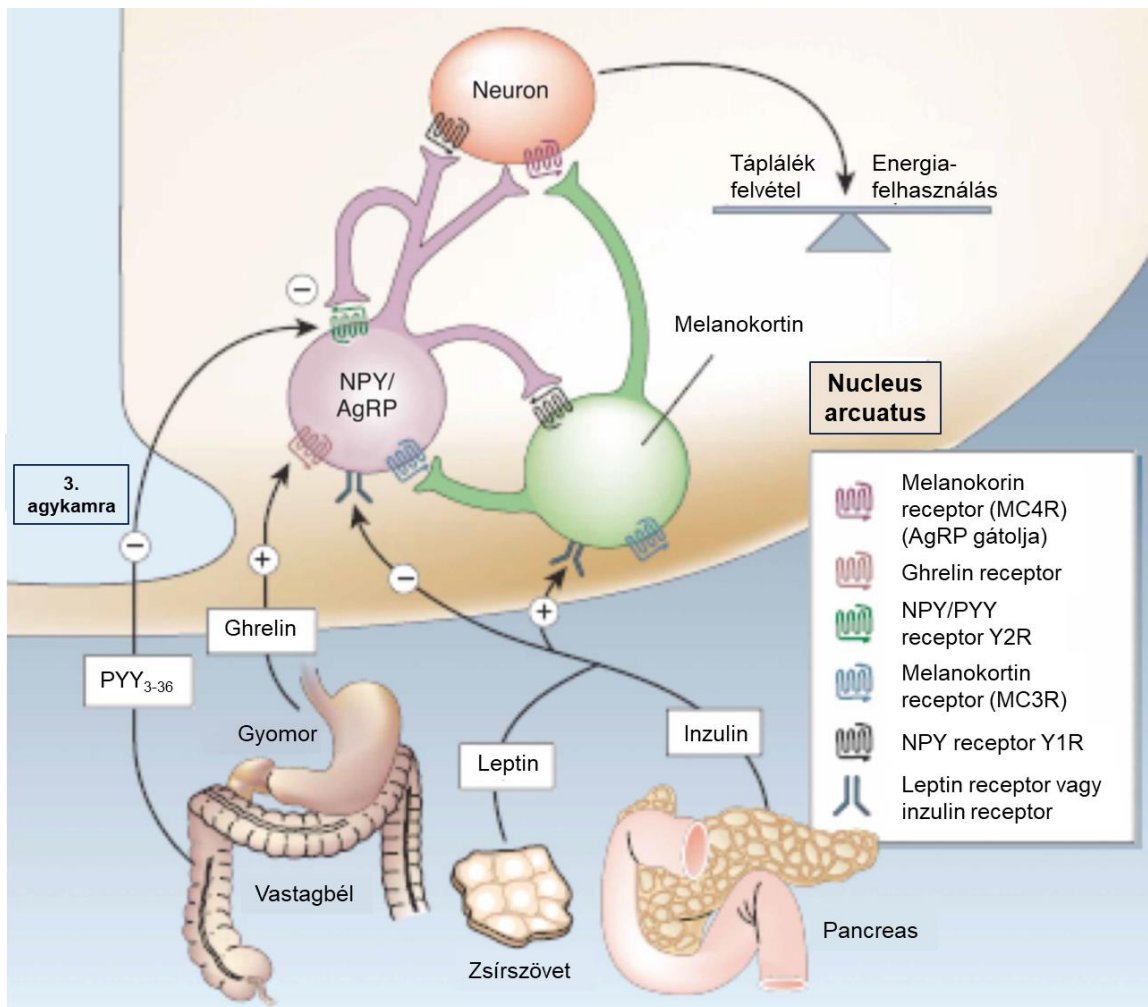
A nucleus arcuatus (ARC) a hypothalamus periventricularis zónájában található, a harmadik agykamra ventralis oldala körül (192). Fiziológiás körülmények között a nucleus arcuatus szabályozza a táplálék- és energiafelvételt. A hypothalamus ARC magjában termelődnek és szekretálódnak az orexigén és anorexigén neuropeptidek. Az orexigén peptidek az Agouti-related protein (AGRP) és a neuropeptid Y (NPY), az anorexigének pedig a proopiomelanokortin (POMC) és a kokain és amfetamin-kapcsolt transzkriptum (CART). Az orexigén peptidek növelik a táplálék felvételt és csökkentik az energiafelhasználást, míg az anorexigén peptidek fordítva viselkednek – csökkentik a táplálék felvételt és növelik az energiafelhasználást. Ezen neuropeptidek szintézise és szekréciója negatív feedback útján szabályozhatók, és ezen mechanizmusok felborulása anyagcsere-zavarokat és étkezési zavarokat okozhatnak (193–195). A táplálékfelvételt rövid- és hosszútávú szabályozással tartja megfelelő keretek között a szervezet. A rövidtávú szabályozás az étkezés elejére és végére korlátozódik, míg a hosszútávú az energia tárolását és fogyasztását befolyásolja (196). Az ARC ezt segít szabályozni, amiben a két neuronpopuláció, az orexigén és anorexigén peptideket szintetizáló sejtek egyaránt részt vesznek (197).

A hasnyálmirigy inzulinja és a zsírszövet leptinje is befolyásolja az ARC neuropeptid szekrécióját. Az inzulin és a leptin gátolják az orexinerg neuropeptidek szekrécióját, míg a POMC-ot serkentik (198). A leptin az ARC-ban a leptin receptor hosszú izoformáján keresztül aktiválja a Janus kináz 2-t (JAK2). A JAK2 egy jelátviteli kaszkádot indít el, ami végül a POMC transzkripciójához, és a NPY és AGRP inhibíciójához vezet (199,200). Az inzulin hatására a hypothalamus ARC régiójában található inzulinreceptorok aktiválódnak, és a receptorhoz kapcsolódó inzulinreceptor szubsztrát 1 és 2 foszforilálódik. Egy jelátviteli kaszkádon keresztül a POMC transzkripciója és szekretálása gátlás alá kerül (201). Szintén a hasnyálmirigy β sejtjeiből felszabaduló amilin is befolyásolja az energiabevitelt, az ARC POMC-pozitív sejtjein keresztül csökkenti a táplálék bevitelt (202). A ghrelin egy orexigén

peptidhormon, ami szintén hatással van a hypothalamus energia-homeosztázist befolyásoló sejtjeire (203). Ghrelin hatására az AGRP sejtekben megnő a transzmitter felszabadulás, míg a POMC sejtekben a ghrelin gátolja azt (5. ábra). Emellett megnövelte az ARC dopaminerg sejtjeinek tüzelési aktivitását (204), vagyis étváagnövelő és csökkenti az energia és oxigénfelhasználást (205).

Máshonnan is kaphat moduláló bemenetet az ARC. A középagyban raphe-magok szerotoninerg sejtjei összeköttetésben vannak a hypothalamus-szal (206). A POMC-pozitív sejteken több szerotonin-receptor is megtalálható (207), és szerotonint felszabadítva a POMC sejteket depolarizálja (208).

Érdekes kísérletben bizonyították, hogy az ARC energia-homeosztázisát irányító sejtjeinek nem szükségesek az étel fogyasztásának hatására felszabaduló hormonok ahhoz, hogy megváltozzon az aktivitásuk. Éber, szabadon mozgó egereknek már maga az étel jelenléte is elég volt ahhoz, hogy az AGRP szintje lecsökkenjen és a POMC szintje megemelkedjen. Ehhez még az első falat előtt elég volt csak látniuk az ételt, és másodpercek alatt beállt a változás (209).



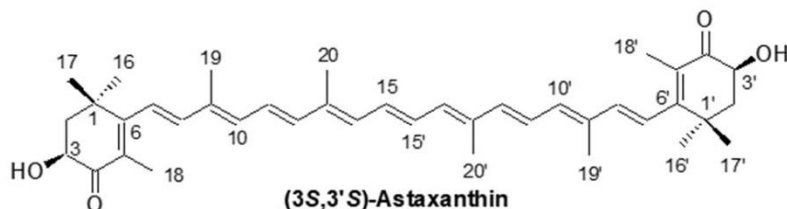
5. ábra A nucleus arcuatus táplálékfelvételt és energiaháztartást szabályozó sejtjei és az azokat befolyásoló hormonok A pancreasból származó inzulin és a zsírszövetből származó leptin gátolják az NPY és AgRP-pozitív sejteket, valamint aktiválják a melanokortin-pozitív sejteket. Az NPY/AgRP sejtek más neuronokon keresztül növelik a táplálék felvételt, míg a melanokortinnak ellentétes, étvágycsökkentő hatása van. Negatív feedback-en keresztül a NPY/AgRP-pozitív sejtek gátolják a melanokortin sejteket. A gyomor által termelt hormon, a ghrelin étvágyserkentő hatású, aktiválja az NPY/AgRP-pozitív sejteket. A vastagbélben termelődő és onnan felszabaduló PYY₃₋₃₆ étvágycsökkentő hatású, gátolja az NPY/AgRP -pozitív sejteket (210).

Az astaxanthin

Az astaxanthin (3,30-dihidroxi-4,40-diketo-karotin, ASX) egy lipofil, tengeri xantofill karotinoid, amit tengeri algafajok termelnek. Például a *Haematococcus pluvialis* (211) és a *Chlorella zofingiensis* (212) is ilyen alga, de termelhetik még baktériumok, mint a *Agrobacterium aurantiacum* és *Bacillus circulans* (213) vagy az élesztőgombák közül a *Phaffia rhodozyma* (214). Ezeket apróbb rákok elfogyasztják, mint pl. *Euphausia superba* (212). Azon fajoknak, amik ilyen algákat vagy rákokat fogyasztanak, az astaxanthin rózsaszínű színezetet ad (pl. flamingó). Attól függően, hogy a rákokból kinyert krill olajat

milyen módszerrel dolgozzák fel, a krill-olaj astaxanthin tartalma 0,1-1,5 mg/ml közé tehető (215,216).

Szerkezetét tekintve az ASX szimmetrikus molekula, két királis szénatommal 3 és 3' pozícióban, amelyekhez hidroxil csoportok kapcsolódnak (217).



6. ábra Az astaxanthin kémiai szerkezete

Az ASX hidrofób szerkezete konjugált poliénből és terminális poláris csoportokból áll, és ez teszi lehetővé, hogy az ASX könnyedén átdiffundálhat a sejtmembránon (218), sőt a mitokondrium membránján is (219). Ez a képessége hozzásegíti, hogy nagyszerű védelmet nyújtson az oxidatív stressz ellen- a reaktív oxigén és a szabadgyökök ellen is egyaránt- a sejtmembrán mindkét oldalán. Tízszer hatékonyabb a szabad oxigén gyökök hatástalanításában, mint a többi karotinoid (220) és ezerszer hatékonyabb a Q10 koenzimnél (221). A *Haematococcus pluvialis* algából kinyert astaxanthint használják a lazac-, garnéla- illetve pisztrángtenyésztésben táplálék kiegészítőként, mivel ezek hújának a színét hasonlóvá teszi a természetben élő társaik húzához (222). Az ASX-t étrendkiegészítőként emberi fogyasztásra is forgalmazzák az USA-ban, Japánban és az Európai Unióban (223).

Az ASX bevitele, mint étrendkiegészítő javította a véráramlást (224) és jótékony hatással volt az eritrocitákra (225,226), de a kutatók biztató eredményeket találtak a gyulladáscsökkentő (227), immunstimuláló (228), antioxidáns (229), rákellenes (230) és antidiabetikus (231), szív- és érrendszeri (232), szem- és bőr (233,234), valamint neuroprotektív (235) hatásairól.

Az ASX lipofil jellege miatt képes átjutni a vér-agy gáton is, így sokat vizsgálták a hatását különböző neurodegeneratív betegségekben (236). Segít a tanulásban, javítja a memóriát és csökkenti a memóriazavarokat (237,238). Emellett az ASX kezelés hatására a hippocampusban megnövekedett a piramis sejtek száma, valamint a sérült sejteknél megfigyelték, hogy ASX hatására ismét az egészséges sejtek morfológiáját vették fel (239), és a neuronális progenitor sejtek proliferációjához is hozzájárult (240). Nem csak a sejtszám

növelésében tud segíteni az ASX, hanem a sejtek megtartásában. Anti-apoptotikus hatásának köszönhetően a kevesebb sejt pusztult el in vitro körülmények között (241).

Humán kísérletekben bizonyították, hogy az ASX idős embereknél csökkentette a demenciában felhalmozódó foszfolipid-hidroperoxid szintjét, ami által az ASX felkerülhet a demencia kezelésének lehetséges hatóanyagai közé (242), de Alzheimer és Parkinson-kór kezelésének lehetőségét is vizsgálják (243,244). Nem csak a neurodegeneratív betegségekben merült fel az astaxanthin használata, hanem az utóbbi években elkezdték vizsgálni a testsúlykontrollban és diétákban a jótékony hatásait.

Célkitűzések

A fent olvasottak alapján ezen értekezésben céljaink közé tartozott megvizsgálni az alábbiakat:

1. Milyen közös és eltérő paramétereik vannak a SIC-eknek egér és humán neocorticalis piramisisejtekből?
2. Hogyan befolyásolják a SIC-ek a szinaptikus plaszticitást?
3. Hogyan hat az öregedés a SIC-ekre és az általuk befolyásolt szinaptikus plaszticitásra?
4. Hogyan befolyásolja az astaxanthin krónikus bevitele a nucleus arcuatus neuronjainak excitábilisát és szinaptikus áramait?
5. Hogyan befolyásolja az akut astaxanthin kezelés nucleus arcuatus neuronjainak excitábilisát és szinaptikus áramait?

Anyagok és módszerek

Oldatok és vegyszerek

Kísérleteinkben általános pufferként, illetve a patch-clamp és kalcium-imaging mérésekhez arteficiális cerebrospinalis folyadékot (aCSF) használtunk, ami a következőkből áll: 120 mmol/l NaCl, 2,5 mmol/l KCl, 26 mmol/l NaHCO₃, 10 mmol/l glükóz, 1,25 mmol/l NaH₂PO₄, 3 mmol/l myo-inozitol, 0,5 mmol/l aszkorbinsav, 2 mmol/l nátrium-piruvát, 2 mmol/l CaCl₂, 1 mmol/l MgCl₂, pH 7,4 (520 mmol/l NaHCO₃ oldattal beállítva), ozmolaritás: 320 mOsm/kg. Ezt bizonyos esetekben módosítottuk. Az agyszeletek preparálásához alacsony nátrium tartalmú aCSF-t használtunk, ahol a NaCl-ot (95 mmol/l) glicerinnel (60 mmol/l) és szacharózzal (130 mmol/l) helyettesítettük. Azokban a kísérletekben, ahol SIC-eket mértünk az aCSF készítésekor kihagytuk a magnézium-kloridot, hogy a szövetek számára úgymond magnéziummentes közeget biztosítsunk. A vegyszereket általában a Sigma-Aldrich cégtől vásároltunk. Amennyiben máshonnan vásároltunk vegyszert, külön feltüntetjük.

Humán minták

A humán szövetek gyűjtése és felhasználása a magyarországi és nemzetközi irányelveknek megfelelően történt. A mintavételre és a kísérletekre vonatkozó protokollokat az Állami Közegészségügyi és Tisztiorvosi Szolgálat (DE KK RKEB/IKEB 4259-2014) hagyta jóvá.

A kísérletekben 13 betegből származó mintát vizsgáltunk. A betegek 38 és 74 év közötti nők (6) és férfiak (7) voltak. Mindegyik beteg valamilyen neocortexet érintő rosszindulatú daganatos betegségben szenvedett (5 glioblastoma multiform, 8 carcinoma metastasis) (1. táblázat). A tumor megközelítése során, a herniáció elkerülése érdekében, illetve a daganat kiújulásának megelőzésének érdekében a betegekből ép corticalis szövet is eltávolításra került, amik túlélő agyszeletek preparálására lettek felhasználva. Azokat a mintákat kizártuk a kísérletből és az adatelemzésből, amelyek tumoros infiltrációra utaló jeleket mutattak. Ilyen jel lehetett a tumorsejtek, vagy limfociták jelenléte, vagy a neuronális akciós potenciál amplitúdójának vagy tüzelési frekvenciájának csökkenése.

A mintákat egy erre a célra kifejlesztett specifikus kamrában szállítottuk az Élettani Intézetbe, egyenesen a műtőből. A kamrában jéghideg (~ 0 - -2 °C), oxigenizált, alacsony Na⁺-tartalmú aCSF biztosította a megfelelő körülményeket. A mintavételtől a

laboratóriumba érkezésig 10 perc telt el. A szövetet a mintafeldolgozás során 200 µm vastag, az agyfelszínre merőleges szeleteket preparáltunk (lásd később). A szeletelési és mérési protokollok a humán és egér minták esetében azonosak voltak.

	Életkor	Nem	Mintavétel helye	Diagnózis
1	38	♀	jobb parietalis cortex	Glioblastoma multiforme
2	45	♀	jobb temporalis c.	Glioblastoma multiforme
3	59	♀	jobb occipitalis c.	Carcinoma metastasis (emlő)
4	59	♂	bal frontalis c.	Carcinoma metastasis (proszta)
5	59	♂	parietalis c.	Glioblastoma multiforme
6	61	♀	jobb frontalis c.	Carcinoma metastasis (kis sejtes neuroendokrin tüdő)
7	63	♀	jobb frontalis c.	Carcinoma metastasis (tüdő)
8	66	♂	jobb temporoparietalis c.	Glioblastoma multiforme
9	67	♂	jobb temporalis c.	Carcinoma metastasis (emlő)
10	68	♀	temporalis c.	Glioblastoma multiforme
11	69	♂	bal frontális c.	Glioblastoma multiforme
12	70	♂	jobb frontális c.	Carcinoma metastasis (gyomor)
13	74	♂	jobb frontalis c.	Carcinoma metastasis (tüdő)

1. táblázat A kísérletben résztvevő betegek adatai

Állatok

Az állatkísérleteket a megfelelő magyarországi és nemzetközi (az állatkísérletekről szóló 2010/63/EU irányelv), valamint a kutatási állatok gondozására vonatkozó intézményi irányelvek és jogszabályok (5/2015/DEMÁB; 19/2019/DEMÁB; 3-1/2019/DEMÁB) szerint végeztük.

A SIC-es kísérletsorozathoz 9-585 napos egereket használtunk mindkét nemből, amik közül voltak kontroll egerek (lox-tdTomato; n = 71), illetve amelyek gliafibrilláris savas fehérje (GFAP) függő módon expresszálták a tdTomato fluoreszcens fehérjét (n = 12). A

GFAP-tdTomato egerek létrehozásához a Jackson Laboratories-tól (Bar Harbor, ME, USA) vásárolt homozigóta floxed-stop-tdTomato (B6;129S6-Gt(ROSA)26Sor^{tm9}(CAG-tdTomato)Hze/J; Jax egerek csatlakozási száma: 007905) és GFAP-cre (B6.Cg-Tg(Gfap-cre) 73.12Mvs/J; Jax-egérszám: 012886) törzseket kereszteztünk a saját állatházunkban.

Fiatal felnőtt (9-12 hetes állatok, mindkét nemből) lox-tdTomato egerekbe sztereotaxiás injekcióval használatra kész vírusokat juttattunk be, amelyek a hM3D(Gq) kemogenetikai aktivátort és a GFAP promóter alatt expresszált mCherry fluoreszcens markert kódoló plazmidokat hordoztak (pAAV GFAP-hM3D(Gq)-mCherry (AAV5); Bryan Roth ajándéka; Addgene plazmid # 50478; <http://n2t.net/addgene:50478>; RRID:Addgene_50478, n = 13; titer: 2×10^{13} GC/ml) vagy kizárólag mCherry markert kontrollként (pAAV-GFAP104-mCherry (AAV5), Edward Boyden ajándéka; Addgene plazmid # 58909; <http://n2t.net/addgene:58909>; RRID:Addgene_58909, (105), n = 10; titer: $1,7 \times 10^{13}$ GC/ml). Az egereket ketamin (100 mg/kg) és xilazin (10 mg/kg) intraperitoneális injekciójával altattuk, és a műtét során egy módosított lemezmelegítővel (Linkam CO102; Linkam Scientific Instruments Ltd.) melegítettük, abból a célból, hogy a testhőmérsékletét 37 °C-on tartsuk. A szem kiszáradását fiziológiás sóoldat cseppekkel akadályoztuk meg. Az altatott egér fejét sztereotaxiás keretbe (RWD Life Science Co., LTD) rögzítettük. A bőr szőrtelenítése és felnyitása után a koponyát egy mikrofúróval (RWD Life Science Co., LTD) 1,5 mm-re a középvonaltól és 1 mm-re caudalisan a bregmától trepanáltuk. A fent leírt vírusokból Hamilton fecskendővel és mikroinjektorral 100-100 nl-t injektáltunk a kéreg felszínére, valamint a parietális kéreg 200 és 400 µm mélységébe (RWD Life Science Co., LTD). A műtét után a koponyát csontviasszal fedtük le, és a bőrt összevarrtuk (5-0 Vicryl, Ethicon). Az érzéstelenítés elmúltával és a következő 2 posztoperatív napon az egerek ibuprofent kaptak fájdalomcsillapítás gyanánt (30 mg/kg; Nurofen Baby, Reckitt Benckiser Ltd.). Ezeket az egereket a műtét után 7-10 napig egyénileg szellőztetett ketrecekben tartottuk. Ezt követően az egereket feláldoztuk, és túlélő agyszeleteket preparáltunk.

Az astaxanthinos kísérletsorozatnál a krónikus, 4 hetes ASX-táplálási kísérletekben fiatal felnőtt (3 hónapos) vad típusú C57BL6 egereket (n = 16) használtunk (8-at ASX-kiegészítéssel ellátott táppal, 8-at pedig normál rágcsálótáppal etettünk). A speciális takarmányt 4 g/kg AstaReal A1010 (100%-os etanolban feloldva) hozzáadásával készítették a standard rágcsáló pelletéhez (fehérje 20%, szénhidrát 70%, zsírok 4%, rostok 5%, vitaminok, mikro- és makrotápanyagok), aminek így a ASX végkoncentrációja 0,02%-os volt (245,246). Az egerek szabadon hozzáférhettek a vízhez és a táplálékhoz. A szoba

megvilágítását automatikus 12 óra sötét - 12 órás világos ciklusra állítottunk be. Az akut kísérletekben a tdTomato fluoreszcens fehérjét proopiomelanocortin (POMC) vagy 2-es típusú glutamátdekarboxiláz (GAD2) függő módon expresszáló egereket (n = 8 mindkét csoportban), valamint a GCaMP6f genetikailag kódolt kalcium-indikátort a 2-es típusú vezikuláris gamma-amino-vajsav transzporter (VGAT2) függő módon expresszáló egereket (n = 3) használtunk mindkét nemből.

Homozigóta floxed-stop-tdTomato (B6;129S6-Gt(ROSA)26Sortm9(CAG tdTomato)Hze/J; JAX egerek csatlakozási száma 007905) és GAD2-cre vonalak (STOCK Gad2tm2(cre)Zjh/J; JAX szám: 010802), valamint a heterozigóta POMC-cre vonalat (STOCK Tg(Pomc1-cre)16Lowl/J; JAX-szám: 005965M) a Jackson Laboratories-tól vásároltuk és az Élettani Intézet állatházában kereszteztük. A VGAT2-GCaMP6 egereket nagylelkűen Dr. Szücs Péter (Debreceni Egyetem, ÁOK, Anatómiai Intézet) bocsátotta rendelkezésünkre, és homozigóta floxed-stop-GCaMP6f (B6;129S-Gt(ROSA)26Sortm95.1(CAG GCaMP6f)Hze/J; JAX szám: 024105) és VGAT2- cre egereket (STOCK Slc32a1tm2(cre)Lowl/J; JAX szám: 016962) szintén a Jackson Laboratories-tól vásároltak, és az Anatómiai Intézet állatházában keresztezték.

A minták preparálása

A szeletek a 200 µm vastagságban készültek koronális síkban a parietális kéreg szintjén és a hypothalamus-t is tartalmazó területről. A preparálás jéghideg (kb. 0 - -2 °C), alacsony Na⁺-tartalmú aCSF-ben Microm HM 650 V vibratom segítségével (Microm International GmbH) történt. A kísérlet megkezdése előtt a szeleteket normál aCSF-ben inkubáltuk 1 órán át 37°C-on.

Elektrofiziológia

A III-IV. rétegben lévő neocorticalis piramis sejteken és a hypothalamus nucleus arcuatus magjának POMC- és GAD-pozitív sejtjein patch-clamp méréseket végeztünk. A patch-pipetták ellenállása 6-8 MΩ volt. A belső oldat összetevői a következők voltak: 120 mmol/l K-glükonát; 5 mmol/l NaCl; 10 mmol/l 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsav (HEPES); 10 mmol/l Na₂-foszfo kreatinin; 2 mmol/l etilén-glikol-bisz(β-aminoetiléter)-N, N, N', N'-tetraecetsav (EGTA); 0,1 mmol/l CaCl₂; 5 mmol/l Mg-ATP; 0,3 mmol/l Na₃-GTP; 8 mmol/l biocitin; és pH 7,3 (1 mol/l KOH oldattal beállítva), ozmolaritás: 280 mOsm/kg. A whole cell patch clamp kísérleteket szobahőmérsékleten (24-26 °C) végeztük Axopatch 200A erősítővel és Axon CNS Digidata 1440A digitalizálóval (Molecular

Devices). A mérésekhez használt mikroelektrodákat PP-830 mikroelektroda húzóval (Narishige) készítettük. Minden adatot a Clampex 10.0 szoftverrel (Molecular Devices) rögzítettünk, az adatelemzéshez pedig a Clampfit 10.0 (Molecular Devices), Synaptosoft MiniAnalysis (Synaptosoft) szoftvereket használtuk. Csak azokat a feszültség-, és áram-clamp méréseket vettük figyelembe, ahol a soros ellenállás 20 M Ω alatt, míg a változás 10%-nál kisebb volt. Emellett csak a stabil, minimális leak árammal rendelkező méréseket lettek a statisztikai adatokban feldolgozva.

Az áram-clamp kísérletekben 1 s hosszúságú, -30 pA-tól +120 pA-ig terjedő, 10 pA nagyságú áramlépcsőkkel áramimpulzusokat alkalmaztunk humán piramis neuronokon, hogy ellenőrizzük a neuronok életképességét, és kizárjuk azokat a neuronokat, amelyeknél a tumoros infiltráció befolyásolhatja az ingerlékenységet. Az ASX kísérletsorozatunk esetében ugyanezt a protokollt használtuk az akciós potenciálok regisztrálásához. A nyugalmi membránpotenciált -60 mV-ra állítottuk be. A spontán tüzelési frekvencia rögzítése áram-clamp módban történt. A neuronokat saját nyugalmi membránpotenciáljukon tartottuk, és nem injektáltunk be áramot. Ötven másodperces felvételeket értékeltünk ki minden egyes neuron és kísérlet esetében.

A SIC-ek, tónusos áramok, spontán EPSC-ek és IPSC-k mérésére szolgáló gap-free felvételeket -60 mV-os tartópotenciálon feszültség-clamp konfigurációban mértük. Az általunk kiváltott EPSC-eket szintén feszültség-clamp konfigurációban rögzítettük. Ezekben a kísérletekben a vizsgált neuront innerváló preszinaptikus rostokat egy volfrám bipoláris elektródával stimuláltuk, nagyjából 50-100 μ m-re a neuron szómájától. A stimuláló elektródát egy BioStim STC-7a (Supertech) stimulátorhoz csatlakoztattuk. Az ingerek amplitúdóját olyan értékre állítottuk be, ahol az EPSC kimaradások (failure) gyakorlatilag eltűntek. Az egyes ingereket 20 másodpercenként adtuk le. A tónusos áramokat úgy értékeltük, hogy hisztogramokat készítettünk a felvétel utolsó percéből rögzített áramok értékéből és a hisztogram csúcsánál lévő áramot tekintettük tónusos áram amplitúdójának. A tartó áram spontán változásait a kontrollfelvétel első és utolsó perce közötti különbségként számoltuk ki.

A méréseket normál aCSF-ben és magnéziummentes aCSF-ben végeztük. Az NMDA receptorok alegység-összetételét vizsgáló kísérletekben 500 nmol/l PPPA-t ((2R*,4S*)-4-(3-foszfopropil)-2-piperidin-karbonsav; GluN2A-specifikus inhibitor; Tocris Cookson Ltd., (247–249)), 5 μ mol/l ifenprodilt ((1R*,2S*)-eritro-2-(4-Benzilpiperidino)-1-(4-

hidroxifenil)-1-propanol hemi-(DL)-tartarát; GluN2B-specifikus inhibitor, Tocris Cookson Ltd., (88,250,251)) és 10 $\mu\text{mol/l}$ D-AP5-öt (D-(-)-2-Amino-5-foszfopentánsav; nem specifikus NMDAR inhibitor, Tocris Cookson Ltd., (252)) használtunk. Más kísérletekben gátoltuk az EAAT1 és 2 glutamát transzporterek működését. Az EAAT1 specifikus gátlószerét, az UCPH101-et (2-Amino-5,6,7,8-tetrahydro-4-(4-metoxifenil)-7-(naftalin-1-il)-5-oxo-4H-króm-3-karbonitril; Tocris Cookson Ltd.) 10 és 25 $\mu\text{mol/l}$ -ben (253,254), az EAAT2 specifikus gátlószerét a WAY213613-t (N-[4-[4-(2-Bróm-4,5-difluorofenoxi)fenil]-L-aszpargin; Tocris Cookson Ltd.) 10 és 100 $\mu\text{mol/l}$ -ben (253–255), míg a nem specifikus EAAT-gátló DL-TBOA-t (DL-treo- β -Benziloxi aszparginsav) 100 $\mu\text{mol/l}$ -ben (256,257) használtuk.

Az elektromos stimulációt az asztróciták kemogenetikai aktiválásával kombináltuk. Ezekben a kísérletekben az egerekbe a fent leírt plazmidokat hordozó vírusvektorokat injektáltuk. A kontroll mérések után 10 $\mu\text{mol/l}$ clozapin-N-oxidot (CNO; Tocris Cookson Ltd.) használtunk. A kontrollkísérleteket naCSF-ben és 0,1%-os DMSO-ban végeztük (mivel a CNO törzsoldatot DMSO-ban oldottuk), valamint 1 $\mu\text{mol/l}$ sztrichninnel és 10 $\mu\text{mol/l}$ bicucullinnal egészítettük ki, amiket a gátló szinaptikus neurotranszmisszió blokkolása érdekében használtunk. Csak azokat a méréseket vettük figyelembe, ahol a spontán, de kemogenetikus aktivációból fakadó SIC-ek 1 s-on belül alakultak ki az kiváltott EPSC-k csúcsához képest.

Egy másik kísérleti elrendezésben 30 $\mu\text{mol/l}$ MNI-caged glutamátot (4-Metoxi-7-nitroindolinil-caged-L-glutamát; Tocris Cookson Ltd.) adtunk a mérőkamrához és az egész kamrát Rapp villanólámpa (Rapp OptoElectronic GmbH) segítségével UV és UV közeli (395 nm alatti hullámhosszúságú) fényel megvilágítottuk, így felszabadítva a glutamátot. A következő kísérletsorozatban a preszinaptikus elektromos ingerléssel együtt a SIC-et, mint feszültségparancsot alkalmaztuk. Ezt a SIC-et korábban egy egér neocorticalis piramis neuronján mértük. A fent leírt két kísérletben a preszinaptikus ingerlés és a glutamát felszabadítás, illetve a mesterséges SIC közötti időzítést különböző értékekre állítottuk. Csak azokat a mérési eredményeket vettük figyelembe, ahol a SIC (vagy glutamátáram) töltésáramlása nagyobb volt 1 pC-nál. A genetikailag kódolt fluoreszcens marker (td-Tomato) vizualizációját egy fluoreszcens képalkotó rendszer (Till Photonics GmbH) segítségével végeztük, amely egy xenon izzó alapú Polychrome V fényforrással, egy CCD-kamerával (SensiCam, PCO AG), egy képalkotó vezérlőegységgel (ICU) és a Till Vision szoftverrel (4.0.1.3 verzió) volt felszerelve.

Az astaxanthint (ASX) vizsgáló kísérletsorozatunkhoz 2,5 $\mu\text{mol/l}$ ASX-t oldottunk 0,1% etanol tartalmú nACSF-ben. A spontán EPSC-kre és IPSC-kre vonatkozó előzetes kísérletekben nem találtunk szignifikáns változásokat a 0,1% etanolt tartalmazó aCSF és az etanolmentes nACSF között, ezért kontrollmérést csak nACSF-ben végeztünk.

Minden mérés utolsó lépése egy gátló koktél alkalmazása volt. A koktél 10 $\mu\text{mol/l}$ NBQX-t (2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,3,4-tetrahidrobenzo[f]kinoxalin-7-szulfonamid), 10 $\mu\text{mol/l}$ D-AP5-t, 1 $\mu\text{mol/l}$ sztrichnint és 10 $\mu\text{mol/l}$ bicucullint tartalmazott. Ez meggátolta a SIC-aktivitást és a gyors szinaptikus neurotranszmissziót, és így ki tudtuk zárni a vizsgált neuron közvetlen ingerléséből származó artefaktumot vagy a szinaptikus eseményekre hasonló váratlan zajt.

Kalcium imaging

A kalcium-imaging mérésekhez a mintákat az elektrofiziológiai kísérleteknél leírtakkal megegyezően preparáltuk. Ezeket a kísérleteket az ASX-t vizsgáló kísérletsorozatunkhoz kapcsolódóan VGAT2-GCaMP6 egerek agyszeletein végeztük. Ehhez egy Zeiss Axioscope mikroszkópot (Carl Zeiss AG) használtunk, amely a fent leírt fluoreszcens képalkotó rendszerrel volt felszerelve. A fluoreszcens szűrőkészlet egy emissziós szűrőt (LP 515, Till Photonics) és egy dikroikus tükröt (Omega XF2031 505DRLPXR; Omega Drive, Brattleboro, VT, USA) tartalmazott. A 344×260 pixel felbontású képkockákat 10 Hz-es képkockasebességgel készítettük.

Morfológiai és immunhisztokémiai vizsgálatok

Az elektrofiziológiai kísérletek során a neuronokat feltöltöttük biocitinnel, és a mérések után az agyszeleteket fixáltuk (4%-os paraformaldehid 0,1 mol/l foszfát puffer; pH 7,4; 4°C), majd később ezeket a neuronok morfológiai azonosításához használtuk. A permeabilizálás Tris pufferelt sóoldattal (TBS) történt, aminek összetétele 8 mmol/l Tris bázis, 42 mmol/l Trisma HCl, 150 mmol/l NaCl, és pH 7,4 volt, kiegészítve 0,1% Triton X-100-zal és 10% szarvasmarha-szérummal (60 perc). Ezt követően 90 percig streptavidin-konjugált Alexa488 (1:300; Molecular Probes Inc.) tartalmú foszfátpuffert alkalmaztunk. A neuronokat és az asztrociták által a vírus befecskendezését követően expresszált mCherry markert konfokális mikroszkópban (Zeiss LSM 510; Carl Zeiss AG) vizualizáltuk; a tile scan képeket 40 \times objektívvel és 1 μm -es z stackkel készítettük.

4%-os paraformaldehiddel fixált agyszeleteken immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk, ahol 8-30 napos fiatal, 90-200 napos felnőtt és 1 évnél idősebb öreg egereket, valamint középkorú és idős (38 és 69 éves) betegekből származó humán mintákat használtuk. A fixált mintákat TBS-ben mostuk, majd 50 µm vastagságú szeleteket készítettünk vibráló mikrotom (Campden Instruments) segítségével. A kettős immunfluoreszcens jelölést úszó agyszeleteken végeztük. A blokkolási és permeabilizációs lépéseket 0,1% Triton X-100-zal és 10% normál szarászérummal kiegészített TBS-ben alkalmaztuk (60 perc). Ezután elsődleges antitestekkel inkubáltuk a mintákat (nyúl anti-GluN2B [Cell Signaling Technology, 1:100], egér anti-GFAP [Synaptic Systems, 1:1000], egér anti-szinaptofizin [Sigma-Aldrich, 1:200]). A mintákat az elsődleges antitestekkel 48 órán keresztül kezeltük 4°C-on, amiket 1% normál szarászérumot és 0,1% Triton X-100-at tartalmazó TBS-ben hígítottunk. A másodlagos antitestekkel való kezelés előtt a mintákat mostuk TBS-sel. A mintákat nyúl ellen termeltetett kecske Cy3 [Life Technologies, 1:1000], egér ellen termeltetett szarász Alexa 488 [Sigma-Aldrich, 1:1000] fluoreszcens másodlagos antitestekkel inkubáltuk, és emellett párhuzamosan Nissl festést is végeztünk (Molecular Probes, 1:200). Végül a mintákat DAPI (4',6 diamidino- 2- fenilindol) tartalmú fedő médiummal (Vector Laboratories) fedtük le. Minden immunhisztokémiai festésről legalább három képet készítettünk (1µm-es rétegfelvételek, 40x objektívet használva) Zeiss lézerpasztázó konfokális mikroszkóppal (Zeiss LSM880 Airyscan; Zeiss). Minden képen három ROI-t (Vizsgált terület - Region of Interest) választottunk ki, és az ImageJ programmal (National Institute of Health) megmértük az átlagos fluoreszcencia-intenzitást (MFI). Itt szeretnénk felhívni a figyelmet, hogy a humán minták az elektrofiziológiai kísérletekből származtak, ezért szuboptimális körülmények között lettek fixálva.

Minden adatot átlag \pm SEM értékben ábrázoltunk. Az adatsorok normál eloszlásának meghatározására normalitás tesztet alkalmaztunk. Két adatsor statisztikai összehasonlítását kétmintás Student t-teszttel értékeltük, míg a többszörös összehasonlításokat Tukey többszörös összehasonlítás tesztjével végeztük. A változásokat akkor tekintettük szignifikánsnak, ha $p < 0,05$ volt. A Pearson-féle korrelációs együtthatót (r) alkalmaztuk a paraméterek közötti korrelációk értékelésére a paraméterek egymáshoz viszonyított ábrázolásával és az adatsorok lineáris illesztésével. A grafikonok és a statisztikai elemzések elkészítéséhez GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) programot használtunk.

Eredmények

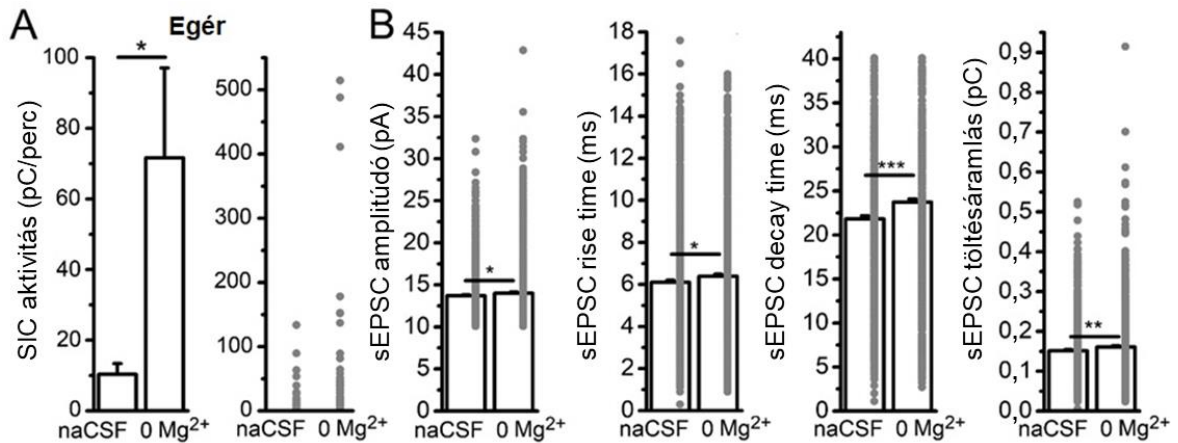
A SIC-ek asztrocita- és GluN2B alegységet tartalmazó NMDAR-függő események egér mintákban

Fellin és mtsai (51), illetve Perea és mtsai (105) munkájának nyomán szeretnénk volna bizonyítani, hogy az általunk vizsgált esemény egy és ugyanaz, mint az eddigi irodalmi adatok bemutattak. Ebben segítségünkre volt, hogy a SIC-ek kinetikája és eredete egyértelműen különbözik az EPSC paramétereitől (173,174): A SIC-ek az asztrociták aktivációjának és a GluN2B alegységet tartalmazó NMDA receptorok megnyílásának következménye.

Egér neocorticalis piramis sejteken feszültség-clamp üzemmódban gap-free felvételeket készítettünk. A tartópotenciál -60 mV volt. A kontroll felvételeket normál aCSF oldatban vettük fel, amit később magnéziummentes aCSF-re cseréltünk. Ugyan a SIC-ek kontroll körülmények között is jelen vannak, a magnéziummentes oldat szignifikánsan megnövelte a SIC-ek percenkénti töltésáramlását (pC; a SIC aktivitását). Magnéziummentes környezetben nem csak a SIC-ek aktivitását növeltük, hanem az EPSC-k amplitúdója, rise time-ja és decay time-ja is megnövekedett, így az EPSC-k töltésáramlása is megnőtt (7. ábra). Erre előzetesen számítottunk. A SIC-ek amplitúdója, rise és decay time-ja és a töltésáramlása (SIC „területe”) is szignifikánsan nagyobb volt, mint az EPSC-k ugyanezen paraméterei (2. táblázat, 8. ábra A és B panel, n=140 neuron). A rise time megfelelő cutoff-értékként szolgált a SIC-ek és EPSC-k elkülönítésében, humán és egér minták esetében is ezt 20 ms-ban határoztuk meg.

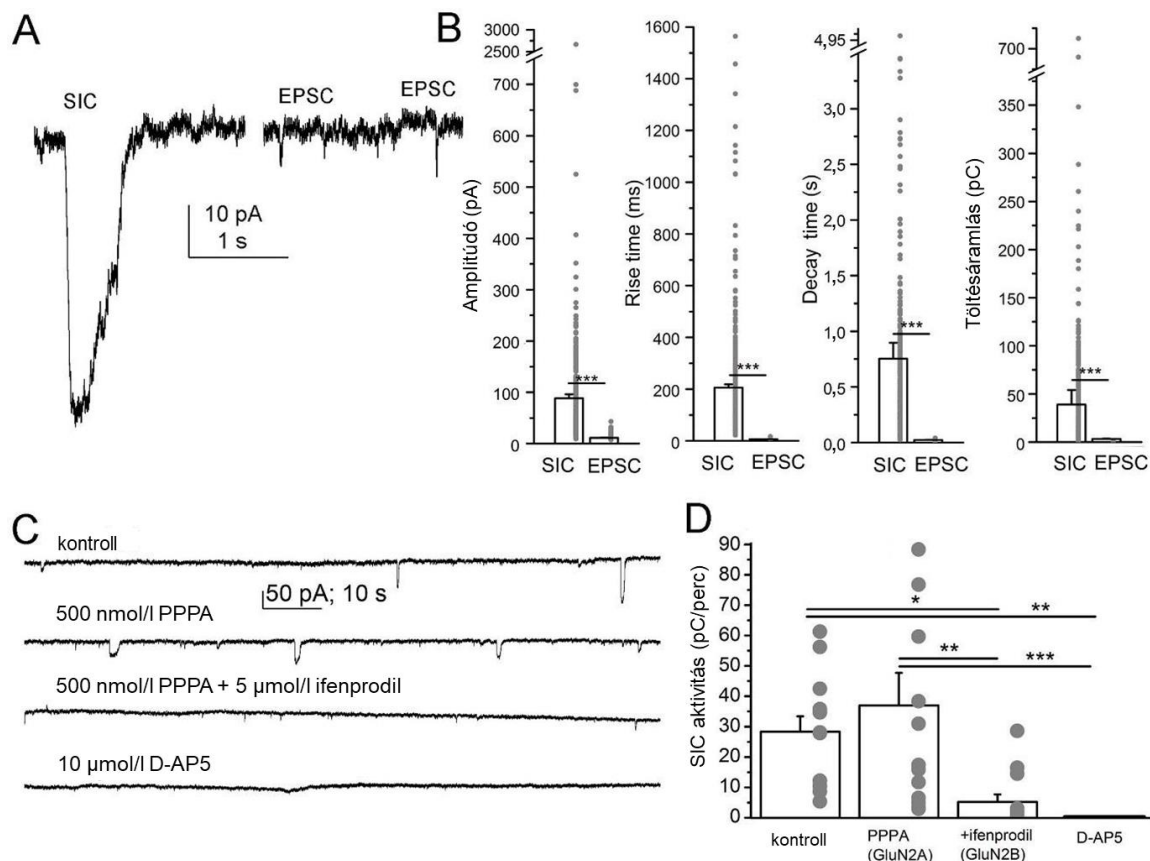
Egér				
Paraméter	SIC		EPSC	
	Átlag±SEM	Tartomány	Átlag±SEM	Tartomány
Amplitúdó (pA)	88,17 ± 8,15	9,23 – 2662,11	11,59 ± 0,13	7,02 -42,88
Rise time (ms)	206,28 ± 12,28	21,33 – 1563,86	6,1 ± 0,11	1,5 - 16
Decay time (ms)	753,99 ± 143,85	25 - 50596	24,42 ± 0,41	3,8 – 40,1
SIC területe (pC)	39,162 ± 3,453	0,635 – 724,807	0,151 ± 0,003	0,032 – 0,914

2. táblázat Egér EPSC és SIC paramétereinek összehasonlítása magnéziummentes környezetben. A SIC-ek és EPSC-k minden paramétere statisztikailag különbözött (n=140; p < 0,0001).



7. ábra A magnéziummentes aCSF szignifikánsan növelte a SIC-ek aktivitását és az EPSC-k paramétereit egér neocorticalis piramis sejteken A; A SIC-aktivitás (a SIC-ek töltésáramlása egy perc alatt) statisztikai összehasonlítása egér minták esetében 1 mmol/l Mg²⁺ (naCSF) és nominálisan magnéziummentes aCSF jelenlétében (bal oldali oszlopok: átlag ± SEM; jobb oldali, szürke pontok: egyedi mérési adatok). Normál aCSF-ben: 10,36 ± 3,05 pC/perc; magnéziummentes oldatban: 71,59 ± 25,46 pC/perc; p = 0,015; n = 140 neuron. **B;** A sEPSC paraméterek statisztikai összehasonlítása az A panelen látható körülmények között (oszlopok: átlag ± SEM, szürke pontok: egyedi mérési adatok) Itt fel szeretnénk hívni a figyelmet, hogy az sEPSC-k amplitúdója, rise time-ja, decay time-ja és töltésáramlása is jelentősen megnövekedett magnéziummentes közegben. *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001

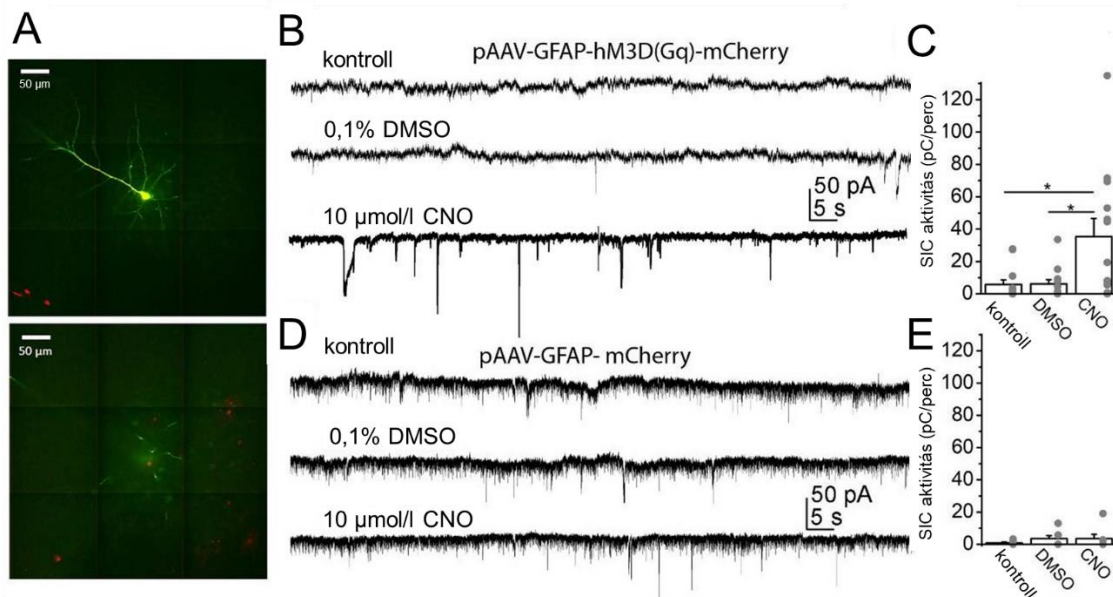
A SIC-ek kialakulásában fontos szerepet játszó NMDA receptorok összetételét vizsgálva GluN2A, GluN2B alegység inhibitor, valamint nem szelektív NMDAR gátlót alkalmaztunk. A kísérletein során a kontrollhoz képest a SIC-aktivitás (28,32 ± 5,01 pC/perc) 500 nmol/l PPPA (GluN2A alegység gátló) hatására nem változott (36,97 ± 10,79; p=0,746; n= 14), viszont 5 μmol/l ifenprodil (GluN2B alegység gátló) hatására a SIC aktivitása szignifikánsan csökkent (5,21 ± 2,46; aCSF vs. ifenprodil p=0,046, PPPA vs. ifenprodil p=0,003; n= 14), 10 μmol/l D-AP5 (nem szelektív NMDAR-gátló) pedig teljesen megszüntette a SIC-eket (8. ábra C és D panel; n= 14).



8. ábra A lassú inward áramok olyan lassú neuronális események, amik az asztrociták és NMDA receptorok aktivációjának következtében jönnek létre **A**; A SIC-ek és az EPSC-k egyértelműen megkülönböztethetők az elektrofiziológiai paramétereik alapján. Bal oldalon egy SIC, jobb oldalon EPSC-k reprezentatív gap-free felvételeit ábrázoltuk (tartópotenciál -60 mV volt). **B**; Statisztikai összehasonlítása a SIC-ek amplitúdójának, rise és decay time-jának, valamint a SIC-ek töltésáramlásának (oszlopok: átlag ± SEM, szürke pontok: egyedi mérési adatok). **C**; A SIC-ek kialakulásához a GluN2B alegységet tartalmazó NMDA receptorok szükségesek. Reprezentatív felvételeket ábrázoltunk kontroll körülmények között (magnéziummentes aCSF, tartópotenciál: -60 mV), 500 nmol/l PPPA jelenlétében (az NMDAR GluN2A alegységének specifikus inhibitora; n= 14), 5 μmol/l ifenprodilal (az NMDAR GluN2B alegység inhibitor; n= 14) és 10 μmol/l D-AP5 jelenlétében (az NMDAR nem specifikus inhibitora; n= 14). **D**; Az előző pontban bemutatott inhibitorok jelenlétében előforduló SIC-ek aktivitásának (egy perc alatti töltésáramlás) statisztikai összehasonlítása (oszlopok: átlag ± SEM, szürke pontok: egyedi mérési adatok). *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

Az asztrocitákat kemogenetikai úton aktiváltuk. Ehhez vektort tartalmazó vírust injektáltunk egerekbe, így az asztrociták hM3D kemogenetikai aktuátort expresszáltak. Az aCSF kontrollhoz képest 0,1 %-os DMSO kontrollt is alkalmaztunk, mivel a CNO – a ligand, amit a kemogenetikai aktiváláshoz használtunk - DMSO-ban oldódott. A CNO hatására a SIC-ek aktivitása szignifikánsan megnőtt (a SIC aktivitása kontroll esetében: $5,79 \pm 2,81$ pC/perc; 0,1% DMSO: $6,22 \pm 2,66$ pC/perc; 10 μM CNO: $35,43 \pm 11,1$ pC/perc; aCSF vs CNO, DMSO vs. CNO p=0,011; n=13). Ezen változások nem voltak megfigyelhetőek, amikor az asztrociták csak mCherry fluoreszcens markert expresszáltak hM3D kemogenetikai aktuátor nélkül (SIC aktivitás aCSF kontrollban: $0,82 \pm 0,53$ pC/perc;

0,1%DMSO: $3,5 \pm 1,88$ pC/perc; CNO: $3,5 \pm 2,63$ pC/perc; aCSF vs CNO, DMSO vs CNO $p=0,58$; $n=13$) (9.ábra).



9. ábra Az asztrociták kemogenetikai aktivációja **A**; A patch-clamp mérések során a neuronokat feltöltöttük biocitinnel. A konfokális rétegfelvétel képeken (méretarány: 50 μm) zöld színnel egy általunk mért neocorticalis piramissejt látható, míg piros színnel az mCherry fluoreszcens markert expresszáló asztrociták láthatóak. **B**; Reprezentatív gap-free felvételek kontroll aCSF és 0,1%-os DMSO-val, valamint 10 $\mu\text{mol/l}$ CNO-val, ami az asztrociták által a GFAP promóter alatt expresszált hM3D(Gq) kemogenetikai aktuátort aktiválta (tartópotenciál: -60 mV). **C**; A SIC aktivitás statisztikai összehasonlítása a B panelen látható körülmények között (oszlopok: átlag \pm SEM, szürke pontok: egyedi mérési adatok; $n=13$). **D**; Reprezentatív gap-free felvételek, ahol az asztrociták csak az mCherry fluoreszcens markert fejezték ki a hM3D(Gq) kemogenetikai aktuátor nélkül. A kísérletet elvégeztük kontroll aCSF és 0,1 % DMSO-ban, valamint 10 $\mu\text{mol/l}$ CNO-val (tartópotenciál: -60 mV). **E**; A SIC-aktivitás statisztikai összehasonlítása a C panelen látható körülmények között (oszlopok: átlag \pm SEM, szürke pontok: egyedi mérési adatok; $n=13$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

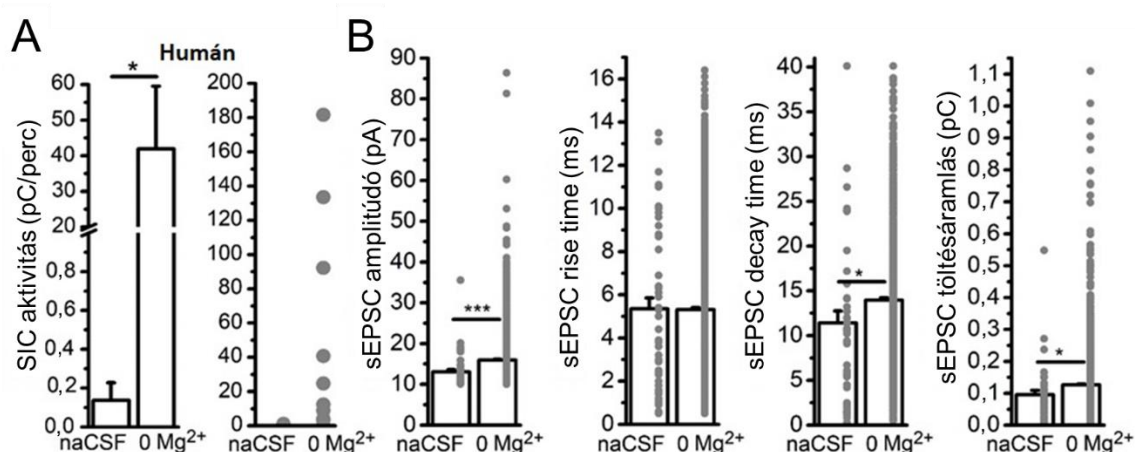
Humán mintákban a SIC-ek asztrocita- és GluN2B alegységet tartalmazó NMDAR-függő események

Lassú inward áramokat korábban is megfigyeltek humán neuronokon (14). Humán neocorticalis piramis sejteken feszültség clamp üzemmódban gap-free felvételeket készítettünk. A tartó potenciál -60 mV volt. A kontroll felvételeket normál aCSF oldatban vettük fel, amit később magnéziummentes aCSF-re cseréltünk. Magnéziummentes környezetben nem csak a SIC-ek aktivitását, hanem az EPSC-k amplitúdója, rise time-ja és decay time-ja is megnövekedett ($n=25$ neuron; 10. ábra), akárcsak az egér minták esetében. A SIC-ek amplitúdója, rise és decay time-ja és a töltésáramlása (SIC „területe”)

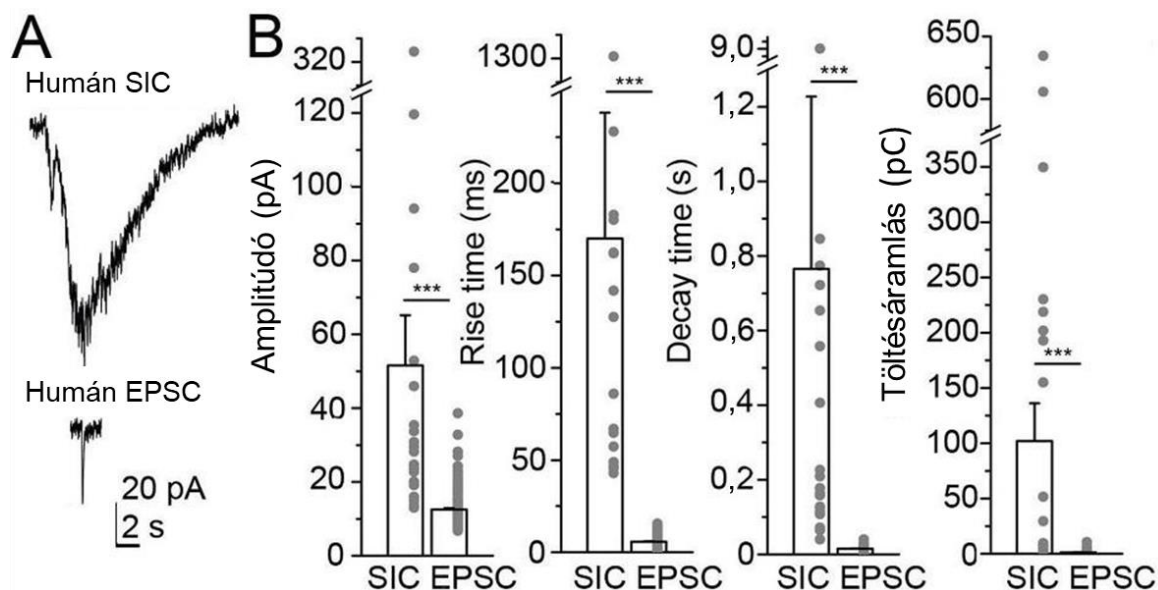
szignifikánsan nagyobb volt, mint az EPSC-k ugyanezen paraméterei, illetve itt is lassabb eseményről beszélhetünk (3. táblázat, 11. ábra), tehát humán mintákban is könnyedén megkülönböztethetőek voltak egymástól a SIC-ek és az EPSC-k.

Humán					
Paraméter	SIC		EPSC		p
	Átlag±SEM	Tartomány	Átlag±SEM	Tartomány	
Amplitúdó (pA)	51,58 ± 13,6	13 - 324	12,56 ± 0,35	6,7 – 38,6	0,13
Rise time (ms)	170,1 ± 68,18	42,9 - 1304	5,69 ± 0,28	0,4 – 15,6	0,25
Decay time (ms)	765,73 ± 461,65	39,94 - 9002	15,39 ± 0,72	1,3 -40,1	0,49
Terület (pC)	101,89 ± 34,13	634,4 – 2007,36	125,08 ± 8,86	8,33 - 1041	< 0,0001

3. táblázat Humán EPSC és SIC paramétereinek összehasonlítása magnéziummentes környezetben. A SIC-ek és EPSC-k minden paramétere statisztikailag különbözött (n = 25 neuron).

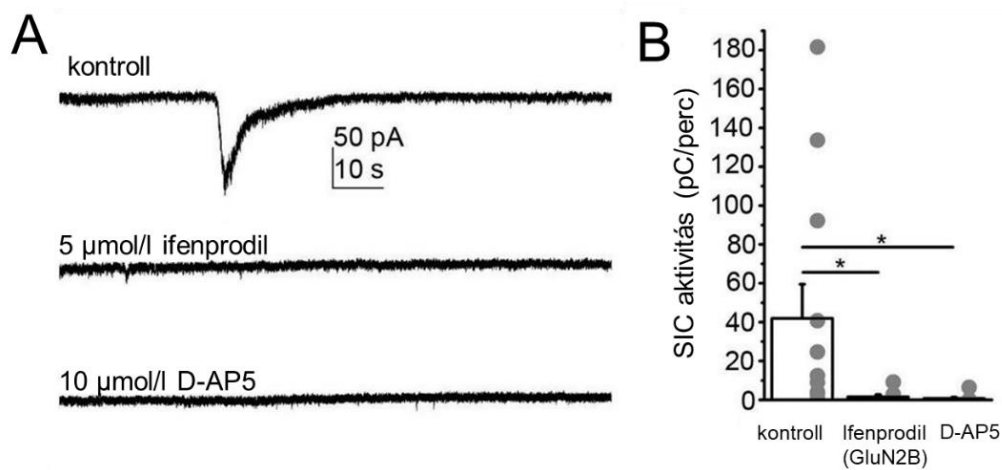


10. ábra A magnéziummentes aCSF szignifikánsan növelte a SIC-ek aktivitását és az EPSC-k paramétereit humán neocorticalis piramis sejteken **A**; SIC-aktivitás (a SIC-ek töltésáramlása egy perc alatt) statisztikai összehasonlítása humán minták esetében 1 mmol/l Mg^{2+} (naCSF) és nominálisan magnéziummentes aCSF jelenlétében (bal oldali oszlopok: átlag ± SEM; jobb oldali, szürke pontok: egyedi mérési adatok **B**; A sEPSC paraméterek statisztikai összehasonlítása az A panelen látható körülmények között (oszlopok: átlag ± SEM, szürke pontok: egyedi mérési adatok) SIC aktivitás: $136,9 \pm 90,8$ pC/perc naCSF-ben; $41,93 \pm 17,58$ pC/perc magnéziummentes oldatban; $p = 0,01$; $n = 25$ neuron. sEPSC amplitúdó: $13,06 \pm 0,54$ pA naCSF-ben; $15,97 \pm 0,19$ pA magnéziummentes oldatban; $p = 0,0009$. sEPSC rise time: $5,35 \pm 0,5$ ms naCSF-ben; $5,31 \pm 0,1$ ms magnéziummentes oldatban. sEPSC decay time: $11,41 \pm 1,33$ ms naCSF-ben; $13,95 \pm 0,27$ ms magnéziummentes oldatban; $p = 0,03$. sEPSC töltésáramlás: $0,096 \pm 0,014$ pC naCSF-ben; $0,126 \pm 0,0028$ pC magnéziummentes oldatban; $p = 0,017$; $n = 1426$ esemény. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$



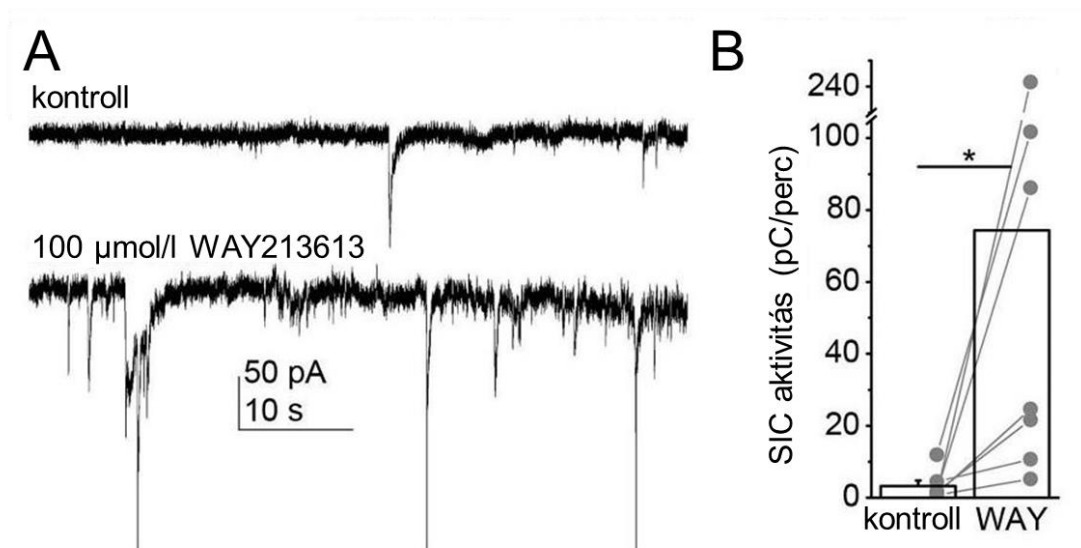
11. ábra Humán SIC és EPSC összehasonlítása **A**; Egy humán SIC (fent) és egy EPSC (lent) reprezentatív gap-free felvételei magnéziummentes környezetben (tartópotenciál: -60 mV). **B**; A humán SIC és EPSC amplitúdók, rise time-ok, decay time-ok és töltésáramlások statisztikai összehasonlítása (oszlopok: átlag ± SEM, szürke pontok: egyedi adatok) *** $p < 0.001$.

Humán minták esetében is megvizsgáltuk az NMDA receptorok összetételét. A SIC aktivitást a kontrollhoz képest ($41,93 \pm 17,59$ pC/perc) a GluN2B alegység gátlószere, 5 $\mu\text{mol/l}$ ifenprodil ($1,55 \pm 1,13$ pC/perc) és az NMDAR nem specifikus gátlószere, 10 $\mu\text{mol/l}$ D-AP5 ($0,71 \pm 0,71$) egyaránt szinte teljesen megszüntette (aCSF vs. ifenprodil: $p=0,02$; aCSF vs. D-AP5: $p=0,018$; ifenprodil vs. D-AP5: $p=0,99$; $n=12$; 12. ábra).



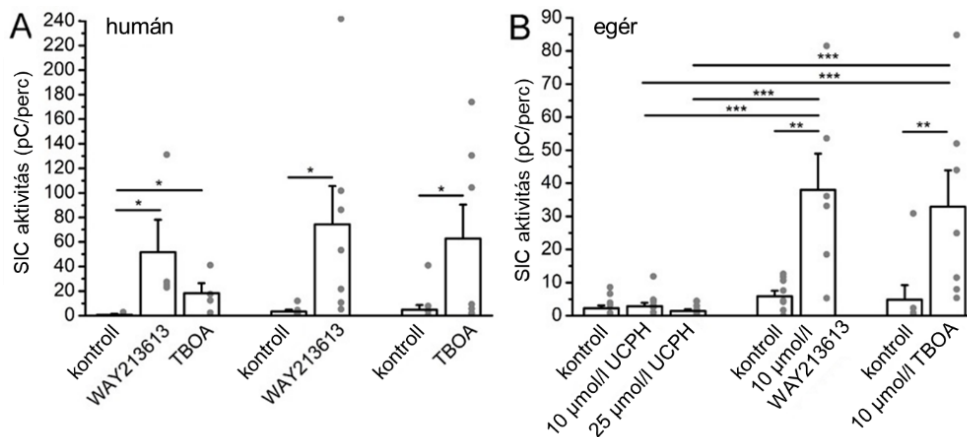
12. ábra Az NMDA receptor-alegységek vizsgálata humán mintákban **A**; Reprezentatív gap-free felvételek kontroll körülmények között, 5 $\mu\text{mol/l}$ ifenprodil (GluN2B alegység gátló) és 10 $\mu\text{mol/l}$ D-AP5 (nem specifikus NMDAR gátló) jelenlétében (tartópotenciál: -60 mV). **B**; Statisztikai összefoglaló a humán sejtek NMDA receptor összetételéről. Az ifenprodil és a D-AP5 szinte teljesen eltüntette a SIC aktivitását ($n=12$; oszlopok: átlag ± SEM, szürke pontok: egyedi mérési adatok). * $p < 0.05$

A humán minták esetében nem volt lehetőség kemo-vagy optogenetikai vizsgálatokra. Ennek helyettesítése céljából, hogy megvizsgáljuk az asztrociták glutamát felszabadulásának hatását a SIC-ekre WAY2131613-at (EAAT2 specifikus glutamát-transzporter gátló) alkalmaztunk. 100 $\mu\text{mol/l}$ WAY szignifikánsan növelte a SIC-aktivitást (kontroll: $0,26 \pm 1,52$ pC/perc; WAY: $74,35 \pm 31,23$ pC/perc; $p=0,02$; $n=7$; 13. ábra) humán sejtekben.



13. ábra A humán sejtek asztrocita glutamát felszabadításának modellezése WAY2131613-al
A; Reprezentatív gap-free felvételek kontroll körülmények között, illetve 100 $\mu\text{mol/l}$ WAY-2131613 (EAAT2 glutamát-traszporter gátló) jelenlétében (tartópotenciál: -60 mV). **B;** Statisztikai összefoglaló az A panelen látható körülmények között. A WAY szignifikánsan megnövelte a SIC aktivitást ($n=7$; oszlopok: átlag \pm SEM, szürke pontok: egyedi mérési adatok). * $p < 0,05$

Az EAAT1 gátlásának a SIC-k megjelenésére gyakorolt hatásának vizsgálatára a nem specifikus DL-TBOA-t alkalmaztuk mind a humán, mind az egér mintákon. A TBOA hozzáadása a WAY213613-hoz (SIC aktivitás WAY után $p=0,05$ és TBOA után $p=0,038$; $n=4$) vagy külön-külön történő alkalmazása (WAY: $p=0,02$; TBOA: $p=0,025$) statisztikailag nem eredményezte a SIC-aktivitás eltérését (14. ábra). Amikor az EAAT1 specifikus gátlására az UCPH101-et alkalmaztuk egérmintákon, nem tapasztaltuk a SIC-aktivitás növekedését ($n=12$; 14. ábra).

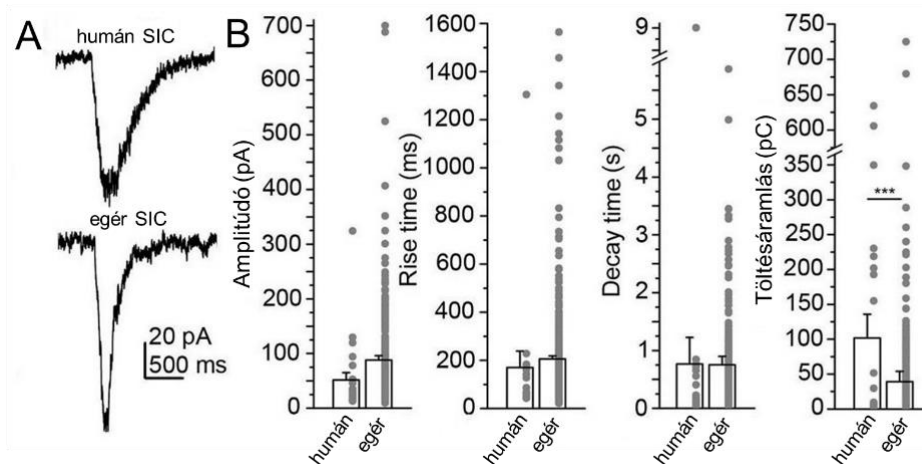


14. ábra Az EAAT2-specifikus glutamát-transzporter gátló WAY213613 ugyanúgy hat a SIC-aktivitásra, mint a nem specifikus EAAT-gátló DL-TBOA. **A**; a WAY213613 és DL-TBOA egymás utáni (n=4; a panel bal oldala) és külön-külön (n=7 és 11; középső és jobb oldal) alkalmazásának hatásai a humán sejteken. Mind a három esetben a SIC-ek aktivitása megnőtt a kontrollhoz képest. **B**; Az EAAT1-specifikus inhibitor UCPH-101 statisztikai összehasonlítása a SIC-aktivitásra különböző koncentrációkban és a WAY, illetve a TBOA hatásával egér mintákban. Az UCPH nem hatott a SIC-aktivitásra (n=12; oszlopok: átlag ± SEM, szürke pontok: egyedi mérési adatok) *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001.

Az általunk mért eredmények a humán és egér mintában összhangban vannak a szakirodalomban leírtakkal (51,105,177,182).

A humán és egér SIC összehasonlítása

Amikor összehasonlítottuk az egér és humán SIC-ek paramétereit, találtunk néhány érdekes különbséget. Bár a különbségek nem voltak szignifikánsak, tendenciaszerű különbséget mutattak. A humán SIC kisebb amplitúdóval rendelkezett, ami részben magyarázható a humán szövetminták vételével és szállításával. Ezen kívül a töltésáramlás szignifikánsan nagyobb volt humán, mint egér mintában (2. és 3. táblázat, 15.ábra).



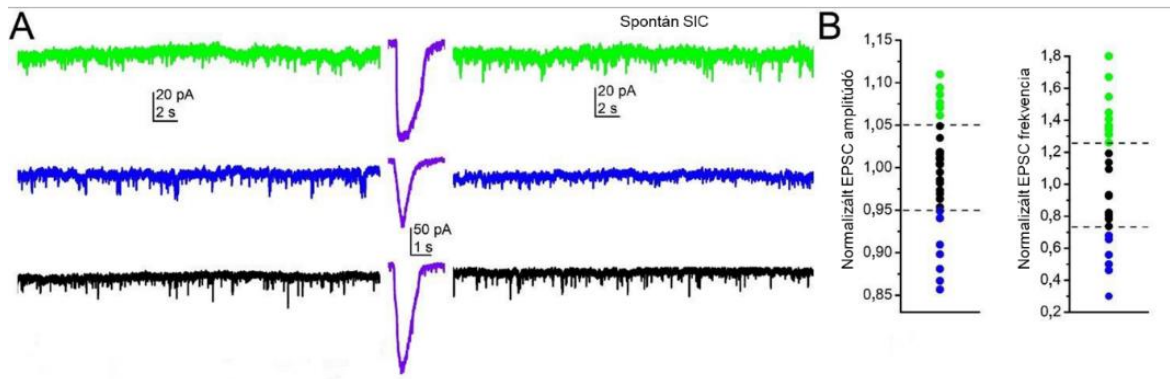
15. ábra A humán és egér SIC-ek összehasonlítása **A**; Egy-egy reprezentatív gap-free felvétel humán (fent) és egér (lent) SIC-ekről (tartópotenciál: -60 mV). **B**; Statisztikai összefoglaló a SIC-ek

két faj közötti különbségeiről. A SIC-ek amplitúdója tendenciaszerűen, de nem szignifikánsan kisebbek voltak, mint egér minták esetében. A töltésáramlás humán neuronokban szignifikánsan nagyobb volt (oszlopok: átlag \pm SEM, szürke pontok: egyedi mérési adatok). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

A SIC-ek elektromos szignálként működnek az időzítésfüggő szinaptikus plaszticitás (STDP) kiváltásakor

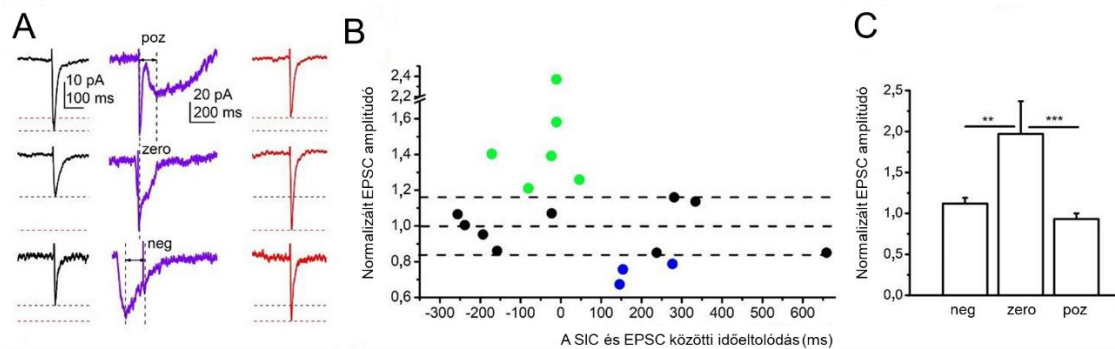
Mivel széles körben elfogadott, hogy az asztrociták kiválthatják vagy befolyásolhatják a szinaptikus plaszticitást (102,167,258,259) és a SIC-ek befolyásolhatják a neuronális excitabilitást (51,105,177,182), ezért feltételeztük, hogy a SIC-ek közvetlenül hathatnak a szinaptikus plaszticitásra.

Spontán EPSC és SIC aktivitásról gap-free felvételeket készítettünk -60 mV tartópotenciálon. A felvételeket normál aCSF-ben kezdtük, majd ezt lecseréltük magnéziummentes aCSF-re. Az egyik kritériuma az adatelemzésnek az EPSC-k paramétereinek stabilitása volt magnéziummentes körülmények között, még mielőtt az első SIC megjelent volna (7. ábra). Csak az 1 pC-nál nagyobb töltésáramlással rendelkező SIC-ek kerültek be az adatelemzésbe. A spontán EPSC-k amplitúdóját és frekvenciáját hasonlítottuk össze az első SIC megjelenése előtt és után. Néhány esetben mind a frekvencia, mind az amplitúdó megnőtt (34,6% a frekvencia és 23% az amplitúdó esetében), míg más mérések alkalmával csökkenést tapasztaltunk (27% mind a frekvencia, mind az amplitúdó esetében). Voltak olyan esetek, ahol nem tapasztaltunk változást (38,4% a frekvencia és 50% az amplitúdó esetében, $n = 26$ eset, 715 esemény). A SIC-ek nélküli kontroll körülményeknél tapasztalt változásokat figyelembe véve az EPSC amplitúdót és frekvenciát 5%-os változáson belül változatlanak tekintettük (16. ábra). Ezek alapján a SIC-ek megváltoztathatják az EPSC-k aktivitását, ami arra utal, hogy a SIC-ek egyfajta szinaptikus plaszticitást váltanak ki.



16. ábra A lassú inward áramok (SIC) képesek befolyásolni a spontán EPSC-eket **A**; Reprezentatív gap-free mérések egér piramis sejtekről (tartópotenciál: -60 mV). Bal oldalon az első spontán SIC-ek előtti gap-free felvételeket, jobb oldalon az első spontán SIC utáni felvételeket ábrázoltuk. Középen lila színnel az első spontán SIC-eket tüntettük fel. (Zöld: megnövekedett EPSC frekvencia és amplitúdó. Kék: csökkent EPSC frekvencia és amplitúdó. Fekete: az EPSC frekvenciában és amplitúdóban nem történt változás.) **B**; Az EPSC-k amplitúdója és frekvenciája az első SIC előtt és után kapott adatokra normalizálva. A pontok az összes egyedi mérési adatokat ábrázolja. (Zöld: megnövekedett EPSC frekvencia és amplitúdó. Kék: csökkent EPSC frekvencia és amplitúdó. Fekete: az EPSC frekvenciában és amplitúdóban nem történt változás; n= 27 eset. Szaggatott vonalak: a spontán fluktuáció határai (5%).)

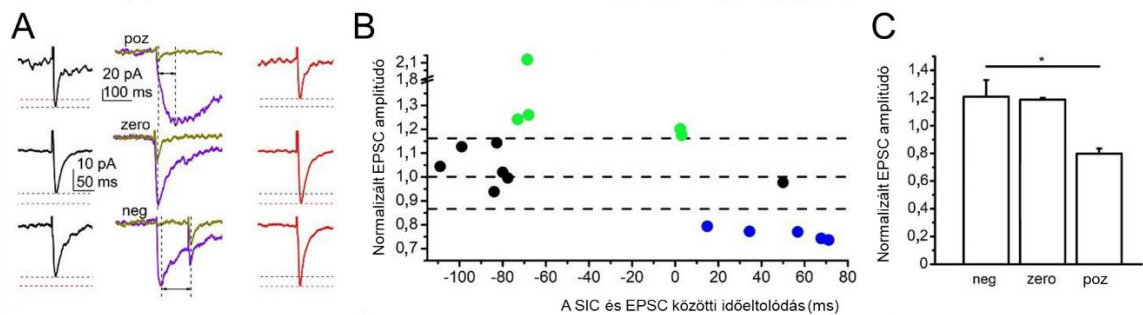
Ahhoz, hogy megvizsgáljuk a SIC-ek szinaptikus plaszticitást befolyásoló szerepének lehetőségét, hM3D kemogenetikai aktuátort használtunk. A hM3D aktuátort expresszáló asztrocitákat az aktuátor ligandjával, CNO-val aktiváltuk. Ezzel egy időben a piramis sejtek excitatórikus szinaptikus bemenetét elektromosan stimuláltuk. Ha a SIC és az elektromos stimulációval kiváltott EPSC csúcsa 1 másodpercen belül volt, megfigyeltük az EPSC amplitúdójának változását. Az esetek felében az EPSC-k amplitúdója hosszútávon megváltozott (n = 18). Ha SIC megelőzte a kiváltott EPSC csúcsát (negatív shift), vagy azzal egy időben történt (zero shift), az EPSC amplitúdó 21-137%-os növekedését tapasztaltuk (n=15). Amennyiben a SIC az EPSC-t követve alakult ki (pozitív shift), az EPSC-k amplitúdójában 22-33%-os csökkenést láttunk (n = 3). Ezen változások a teljes mérési idő alatt fennmaradtak (40 perc). Az esetek másik felében az EPSC-k amplitúdójának változása 16%-nál kisebb volt, ami gyakorlatilag megfelel a spontán fluktuációnak (17.ábra).



17. ábra A kemogenetikai asztrocita-aktivációval kiváltott SIC-ek hatása az EPSC-k változására időzítésfüggő A; Reprezentatív gap-free felvételek az asztrociták kemogenetikai aktivációja révén létrejött SIC-ekről, illetve az EPSC-kről a SIC-ek előtt és után, amik a piramis sejtek excitatorikus bemenetét stimulálva jöttek létre (tartópotenciál: -60 mV). Fekete színnel ábrázoltuk (bal oldalon) a SIC-ek előtti 10 EPSC-k átlagait. Lila színnel (középen) látható az általunk használt EPSC-k és SIC-ek közötti időzítés (poz: A SIC követi az EPSC-t; zero: az EPSC és SIC csúcsai egy időben jelentek meg; neg: a SIC megelőzi az EPSC-t). Piros színnel a SIC-ek utáni 10 EPSC átlagát ábrázoltuk (jobb oldalon). **B;** A SIC-ek után megváltozott EPSC amplitúdók egyedi mérési adatpontjai, amiket a SIC előtti amplitúdóhoz normalizálva ábrázoltunk az EPSC és SIC között mért időbeli különbség függvényében (zöld: növekedés, kék: csökkenés, fekete: nincs változás). Szaggatott vonallal jelöltük a spontán fluktuáció határértékét ($100\% \pm 16\%$). **C;** Az EPSC amplitúdók statisztikai összehasonlítása, ahol a SIC az EPSC-t megelőzi (neg), követi azt (poz), vagy egy időben történik vele (zero). (n=18; oszlopok: átlag \pm SEM) **p < 0,01; ***p < 0,001.

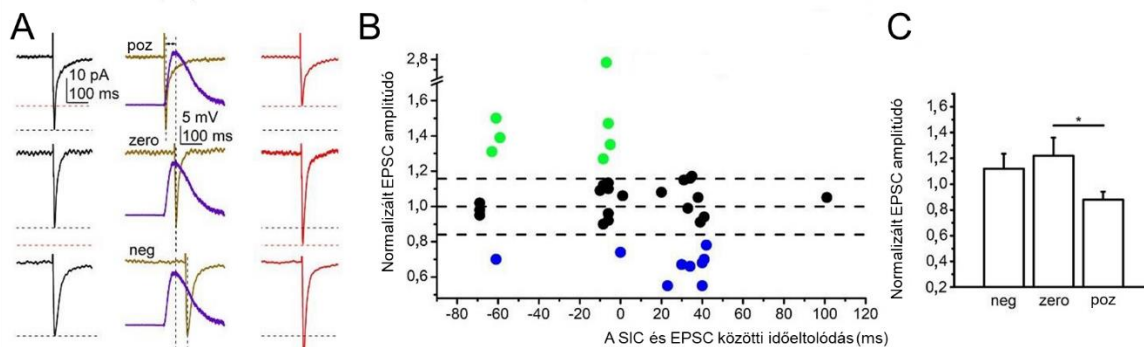
Az összes adatot összevetve a SIC és EPSC közötti negatív, illetve zero shift az EPSC-k amplitúdójának hosszútávú megnövekedéséhez, míg a pozitív shift csökkenéshez vezetett. Ezen eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az asztrociták kemogenetikai aktivációjával kiváltott SIC időzítésfüggő módon befolyásolja a plaszticitást.

Mivel az asztrociták aktivációjával nem csak glutamát szabadul fel, vagy nem csak a glutamát felvétele változik meg, az EPSC-kben bekövetkező változások az asztrocita aktivációnak több különböző következményeként is létrejöhet. Annak érdekében, hogy kizárhassuk más tényezők befolyását és bizonyosságot szerezzünk, hogy az asztrociták glutamát felszabadulása a változások okozója, villanófényes fotolízissel MNI-caged glutamátot szabadítottunk fel. A piramis sejt excitatorikus bemenetét stimulálva EPSC-eket váltottunk ki és a villanófény általi glutamát felszabadulást a fentiekben leírtak szerint időzítettük. Az esetek több, mint felében (58%) megfigyelhető volt az EPSC-k hosszútávú változása (n = 17). Ha a glutamát felszabadulás indukálta áram megelőzte az EPSC-t (negatív shift), vagy azzal egy időben jelent meg (zero shift), az amplitúdó 17-116%-kal megnőtt. Amikor a glutamát-indukált áram az EPSC után jelent meg (pozitív shift), akkor az EPSC-k amplitúdója csökkent (21-26%). Az előző kísérlethez hasonlóan a SIC gyenge STDP-t váltott ki (18. ábra).



18. ábra A 30 μM MNI-caged glutamát felszabadulásával kiváltott SIC-szerű események időzítéstől függően befolyásolják a plaszticitást **A**; Reprezentatív gap-free felvételek az EPSC-kről és a glutamát áramokról (tartópotenciál: -60 mV). Fekete színnel ábrázoltuk (bal oldalon) a glutamát áramok előtti 10 EPSC-k átlagait. Sötét sárga színnel az elektromos stimulációval kiváltott EPSC-eket ábrázoltuk. Lila színnel (középen) látható a glutamát áram és nyilakkal, valamint szaggatott vonalakkal jelölt az általunk használt EPSC-k és glutamát áramok közötti időzítést (poz: A glutamát áram követi az EPSC-t; zero: az EPSC és a glutamát áram csúcsai egy időben jelentek meg; neg: a glutamát áram megelőzi az EPSC-t). Piros színnel a glutamát áramok utáni 10 EPSC átlagát ábrázoltuk (jobb oldalon). **B**; A glutamát áramok után megváltozott EPSC amplitúdók egyedi mérési adatpontjai, amiket a glutamát áram előtti amplitúdókhöz normalizálva ábrázoltunk az EPSC és glutamát áram között mért időbeli különbség függvényében (zöld: növekedés, kék: csökkenés, fekete: nincs változás). Szaggatott vonallal jelöltük a spontán fluktuáció határértékét ($100\% \pm 16\%$). **C**; Az EPSC amplitúdók statisztikai összehasonlítása, ahol a glutamát áram az EPSC-t megelőzi (neg), követi azt (poz), vagy egy időben történik vele (zero). ($n=17$; oszlopok: átlag \pm SEM) * $p < 0,05$

Annak vizsgálatára, hogy a SIC-ek poszt-szinaptikus elektromos jelekként megváltoztatják-e a szinaptikus erősséget, egy korábban rögzített SIC-et feszültségparancsá alakítottunk át és a fent leírtakhoz hasonló időzítéssel alkalmaztuk. Ezek a mesterséges SIC-ek gyenge STDP-szerű plaszticitást idéztek elő, ahogyan azt a korábbi manipulációkkal is láttuk (17. és 18. ábra). Az esetek 44%-ban változtak meg az EPSC amplitúdók a SIC-parancsok hatására ($n = 36$). A SIC-parancs és az elektromos stimuláció hatására kiváltott EPSC közötti negatív és zero shift az esetek 35%-ban okozott 27-177%-os EPSC amplitúdó növekedést, és az esetek 10 %-ban okozott 26-30%-os csökkenést. A pozitív shift hatására az EPSC amplitúdó 28-45%-os csökkenést mutatott. Itt nem találtunk növekedést.



19. ábra A SIC-re, mint feszültségparancsra kiváltott depolarizációra válaszul az elektromos stimulációval kiváltott EPSC-k időzítésfüggően változtak **A**; Reprezentatív gap-free felvételek az EPSC-kről és a SIC-ekről (tartópotenciál: -60 mV). Fekete színnel ábrázoltuk (bal oldalon) a SIC-ek előtti 10 EPSC-k átlagait. Sötét sárga színnel az elektromos stimulációval kiváltott EPSC-eket ábrázoltuk. Lila színnel (középen) látható a feszültségparancsként adott SIC, és nyilakkal, valamint szaggatott vonalakkal jelöltük az általunk használt EPSC-k és SIC-ek közötti időzítést (poz: A SIC követi az EPSC-t; zero: az EPSC és a SIC csúcsai egy időben jelentek meg; neg: a SIC megelőzi az EPSC-t). Piros színnel a SIC-ek utáni 10 EPSC átlagát ábrázoltuk (jobb oldalon). **B**; A SIC-ek után megváltozott EPSC amplitúdók egyedi mérési adatpontjai, amiket a SIC előtti amplitúdókhöz normalizálva ábrázoltunk az EPSC és SIC között mért időbeli különbség függvényében (zöld: növekedés, kék: csökkenés, fekete: nincs változás). Szaggatott vonallal jelöltük a spontán fluktuáció határértékét (100%±16%). **C**; Az EPSC amplitúdók statisztikai összehasonlítása, ahol a SIC az EPSC-t megelőzi (neg), követi azt (poz), vagy egy időben történik vele (zero). (n=36; oszlopok: átlag ±SEM) *p < 0,05

Összefoglalván az alábbi táblázatba gyűjtöttük össze a fejezetben leírt változásokat.

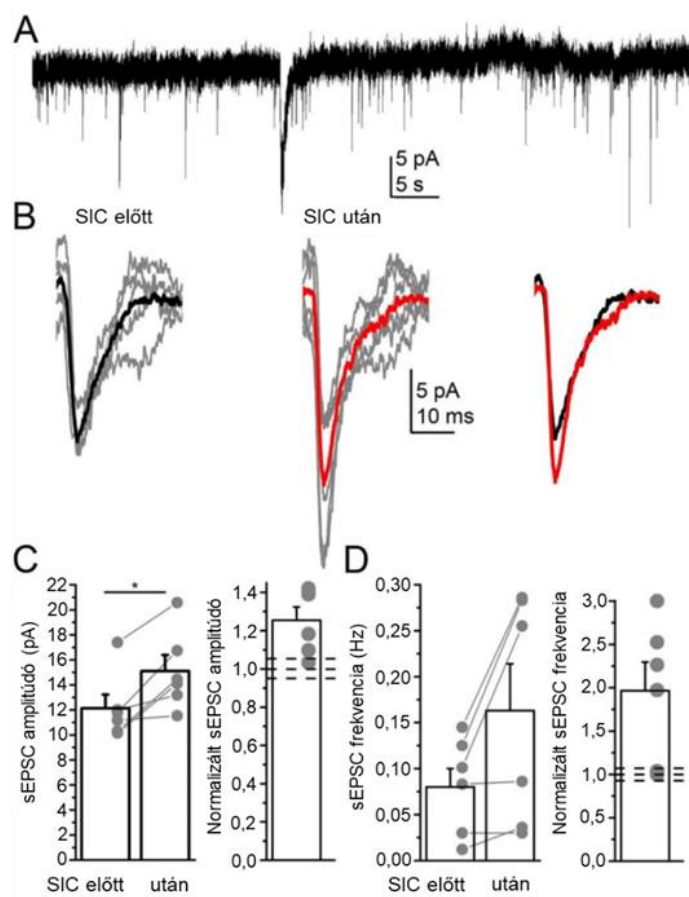
	'negatív shift'	'zero shift'	'pozitív shift'	p	n
<i>kemogenetikai aktivációval kiváltott SIC</i>	1,12 ± 0,7	1,96 ± 0,39	0,93 ± 0,08	negatív vs. zero: 0,0015 zero vs. pozitív: 0,0002	18
<i>Glutamát uncaging</i>	1,21 ± 0,12	1,19 ± 0,01	0,79 ± 0,04	negatív vs. pozitív: 0,038	17
<i>SIC, mint posztszinaptikus elektromos szignál</i>	1,12 ± 0,11	1,22 ± 0,14	0,88 ± 0,06	pozitív vs. zero: 0,041	36

4. táblázat A SIC-ek hatására az EPSC amplitúdók változásai a különböző időzítések során. Az EPSC-eket a SIC-ek megjelenése előtti amplitúdókra normalizáltuk.

Összegezvén a fejezetben leírtakat, a SIC-ek elektromos jelként a posztszinaptikus neuronon hatva képesek a szinaptikus erősséget hosszabb ideig megváltoztatni.

A SIC-ek hatása a szinaptikus plaszticitásra humán mintákban

Mivel az előző fejezetben leírt kísérleteket egereken végeztük, szeretnénk volna megvizsgálni a lehetőségét, hogy hasonló mechanizmusok az emberekben is vannak-e. A gap-free felvételeket az egér-kísérleteknél leírt kritériumok szerint végeztük, magnéziummentes oldatban. Azt találtuk, hogy az EPSC-k amplitúdója és frekvenciája az első SIC után megnőtt és időben hosszantartó változásnak bizonyult. A spontán fluktuációt 5%-ban állapítottuk meg, azokat a mérési adatokat, amik ez alatt voltak, nem vettük be a statisztikába. Az EPSC amplitúdók az esetek 83%-ában 10-42%-os növekedést mutattak (n=10). 66%-ban az EPSC-k frekvenciája is megnövekedett. Habár az egerek esetében volt példa csökkenésre, itt nem találtunk ilyen esetet (20. ábra, 5. táblázat).



20. ábra A humán lassú inward áramok (SIC) az egerekhez hasonlóan szinaptikus plaszticitást váltanak ki **A**; Reprezentatív gap-free felvétel egy humán neocorticalis piramis sejtről (tartópotenciál: -60 mV). **B**; A spontán EPSC-k átlaga az első SIC előtt és után. Bal oldalon feketével jelöltük a 32 egyedi mérésekből származó spontán EPSC-k átlagát SIC előtt, szürke színnel 5 reprezentatív spontán EPSC-t tüntettünk fel. Középen piros színnel jelöltük az 51 egyedi mérésből származó spontán EPSC-k átlagát a SIC után, szürke színnel 5 reprezentatív spontán EPSC-t tüntettünk fel. Jobb oldalon a SIC előtti (fekete) és SIC utáni (piros) EPSC-k átlagát vetítettük egymásra. **C**; A spontán EPSC-k amplitúdójának statisztikai összefoglalója az első SIC előtt és után (bal oldalon) és a SIC-ek utáni EPSC -k amplitúdója a kontrollhoz normalizálva (jobb oldalon). A sEPSC- frekvenciájának statisztikai összegzése, az előző panelen megegyező elrendezéssel. (n=10;

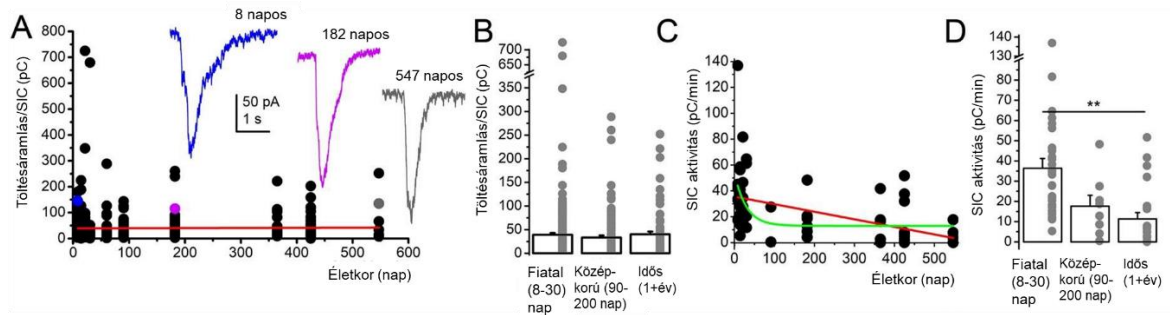
oszlopok: átlag \pm SEM, szürke pontok és vonalak: egyedi mérési adatok; szaggatott vonalak: 100% \pm 5%-os ingadozási határ; * $p < 0,05$.)

	Az első SIC előtt	Az első SIC után	Normalizált paraméter (után/előtt)	p
<i>sEPSC</i> amplitúdó (pA)	12,13 \pm 1,1	15,1 \pm 1,3	1,25 \pm 0,07	0,05
<i>sEPSC</i> frekvencia (Hz)	0,08 \pm 0,02	0,16 \pm 0,05	1,97 \pm 0,33	0,08

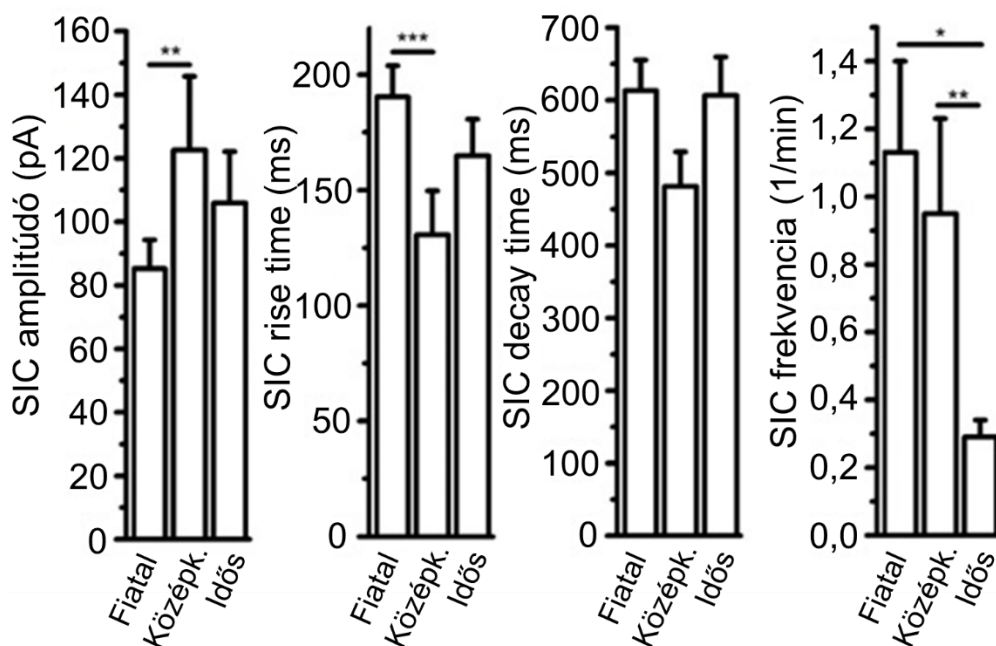
5. táblázat Az EPSC-k paramétereiben bekövetkező változások az első SIC előtt és után

Az egér és humán SIC-ek öregedése és azok hatása a szinaptikus plaszticitásra

Szerettük volna megvizsgálni, hogy az öregedés hogyan befolyásolja a SIC-eket és azok hogyan hatnak a szinaptikus plaszticitásra. 9-547 napos egerek mérési adataiban vizsgáltuk a SIC-eket, ahol azt találtuk, hogy a töltésáramlás nem változott az életkorral, viszont az amplitúdó, a rise time és decay time az életkorral együtt ingadozott. Ezek mellett egér mintákban a SIC-ek frekvenciája életkorfüggő módon szignifikánsan csökkent, és emiatt a SIC-ek aktivitása is mutatott némi csökkenést (n=62; 21. és 22. ábra, 6. táblázat).



21. ábra A lassú inward áramok (SIC) korfüggése egér mintákban A; A töltésáramlást (a SIC „területe”) ábrázoltuk az életkor függvényében. Különböző életkorú egerekből származó SIC-ekről reprezentatív gap-free felvételeket emeltünk ki kék, lila és szürke színekkel (a grafikonon ugyanazon színnel jelöltük a felvételekhez tartozó adatpontot). B; A SIC-ek töltésáramlásának statisztikai összefoglalója különböző életkori tartományban (n=62; oszlopok: átlag \pm SEM, szürke pontok: egyedi mérési adatok). C; A SIC aktivitása az életkor függvényében (fekete pontok: egyedi mérési adatok; piros vonal: lineáris illesztés; zöld vonal: exponenciális illesztés). D; A SIC-ek aktivitásának statisztikai összefoglalója különböző életkori tartományban (n=62; oszlopok: átlag \pm SEM, szürke pontok: egyedi mérési adatok; ** $p < 0,01$)



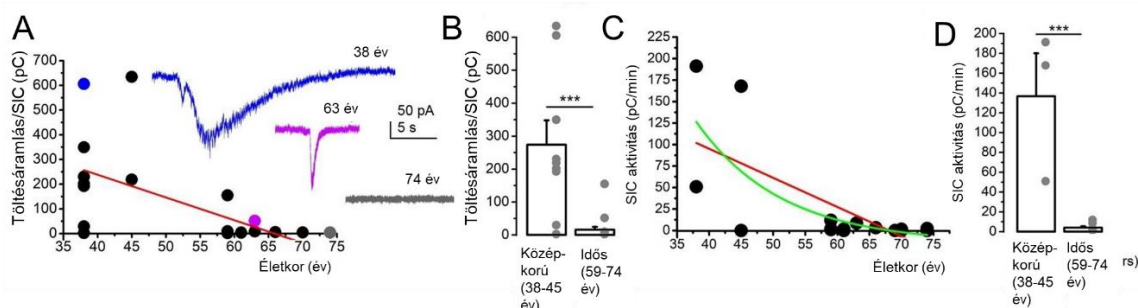
22. ábra Az életkorral bekövetkező változások a SIC-ek paramétereiben egér mintákban. Az életkor előrehaladtával (Fiatal: 8-30 napos; Középkorú: 90-200 napos; Idős: 1 évnél idősebb) a SIC-ek amplitúdójában szignifikáns változást találtunk a fiatal és középkorú példányok között. A fiatal csoportban az amplitúdó $85,25 \pm 9,05$ pA volt, középkorúban $112,63 \pm 23,2$ pA és az idősben $105,9 \pm 16,26$ pA volt (fiatal vs középkorú $p=0,0027$). A rise time a fiatal csoportban $190,32 \pm 13,58$ ms volt, középkorúakban $130,66 \pm 19,03$ ms, idősben $164,9 \pm 15,8$ ms, (fiatal vs. középkorú $p = 0,0008$). A decay time a fiatal csoportban $613,45 \pm 42,06$ ms volt, középkorúban $481,5 \pm 47,5$ ms, idősben $606,9 \pm 52,76$ ms volt. A frekvencia a fiatal csoportban $1,13 \pm 0,27$ /min volt, középkorban $0,95 \pm 0,28$ /min, idősben $0,29 \pm 0,05$ /min volt (fiatal vs idős $p=0,021$; középkorú vs idős $p=0,002$). (n=62; Oszlopok: átlag \pm SEM. *: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ***: $p<0,001$)

	Fiatal	Középkorú	Idős	Illesztési paraméterek	p
Egér (n = 395 SIC 62 állatból)					
Egyedi SIC töltésáramlás (pC)	$39,1 \pm 3,95$	$33,13 \pm 4,5$	$40,27 \pm 5,6$	$r^2 = -0,0024$; meredekség: $5,3$ fC/nap	
SIC aktivitás (pC/perc)	$36,34 \pm 6,81$	$17,63 \pm 5,39$	$12,16 \pm 3,6$	exponenciális: $r^2 = 0,21$, $\tau = 29,33$ lineáris: $r^2 = 0,206$, meredekség: $-58,4$ fC/min/nap	fiatal vs. idős: $0,0011$

6. táblázat Táblázatos összefoglaló az életkorral bekövetkező változásokról a SIC-ek paramétereiben egér mintákban. Életkori kategóriák: fiatal: 8-30 napos, középkorú: 90-200 napos, idős: 1 évnél idősebb.

Az egereknél tapasztalt eredményekkel ellentétben a humán SIC-ek töltésáramlásában és aktivitásában drasztikus csökkenést tapasztaltunk az életkor előrehaladtával. A

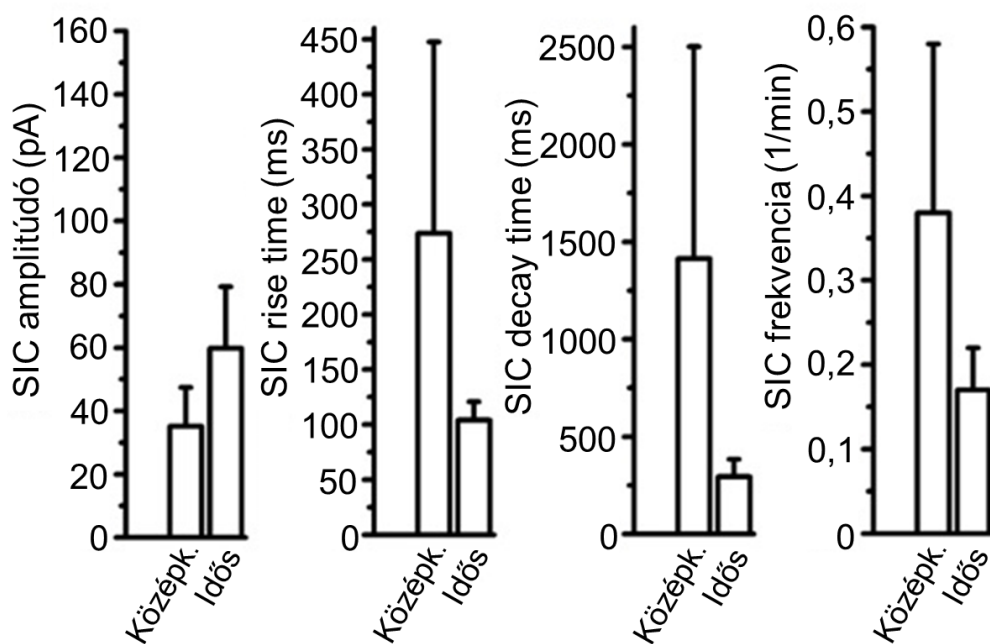
legérdekesebb különbség, hogy a humán mintáknál 70 év felett a SIC-ek teljesen eltűntek. A töltésáramlás csökkenésének különböző okai lehetnek, ezek közül az egyik, hogy idős korban a SIC-eknek gyorsabb a kinetikája és csökkent a frekvenciája (n=29; 23. és 24. ábra, 7. táblázat).



23. ábra A lassú inward áramok (SIC) korfüggése humán mintákban A; A töltésáramlást (a SIC „területe”) ábráztuk az életkor függvényében. Különböző életkorú betegek mintáiból származó SIC-ekről reprezentatív gap-free felvételeket emeltünk ki kék, lila és szürke színekkel (a grafikonon ugyanazon színnel jelöltük a felvételekhez tartozó adatpontot). **B;** A SIC-ek töltésáramlásának statisztikai összefoglalója különböző életkori tartományban (n=29; oszlopok: átlag ± SEM, szürke pontok: egyedi mérési adatok). **C;** A SIC aktivitása az életkor függvényében (fekete pontok: egyedi mérési adatok; piros vonal: lineáris illesztés; zöld vonal: exponenciális illesztés). **D;** A SIC-ek aktivitásának statisztikai összefoglalója különböző életkori tartományban (n=29; oszlopok: átlag ± SEM, szürke pontok: egyedi mérési adatok; ***p < 0,001.)

	Középkorú	Idős	Illesztési paraméterek	p
Humán minták (n = 29 SIC 12 betegből)				
<i>Egyedi SIC töltésáramlás (pC)</i>	273,9 ± 74,1	15,9 ± 8,6	r ² = 0,36; meredekség: -9203,1 fC/év	
<i>SIC aktivitás (pC/perc)</i>	136,6 ± 43,4	4,03 ± 1,42	exponenciális: r ² = 0,484; τ = 13,34; lineáris: r ² = 0,467; meredekség: -3389,4 fC/min/év	középkorú vs idős: < 0,0001

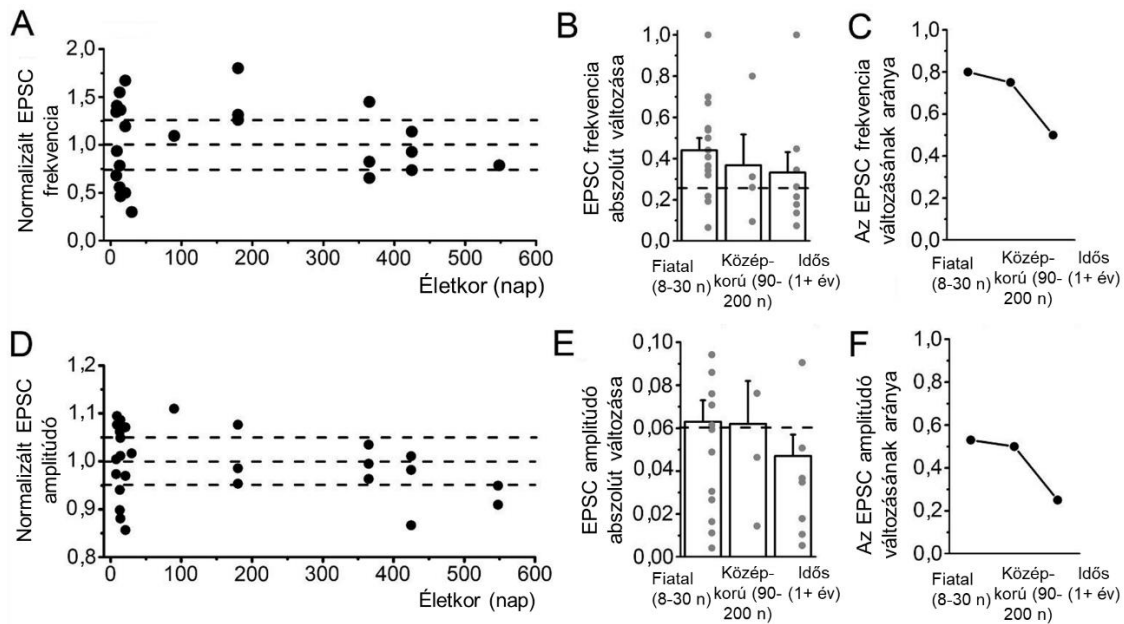
7. táblázat Táblázatos összefoglaló az életkorral bekövetkező változásokról a SIC-ek paramétereiben humán mintákban Életkori kategóriák: középkorú: 38-45 éves, idős: 59-74 éves



24. ábra Az életkorral bekövetkező változások a SIC-ek paramétereiben humán mintákban Az életkor előrehaladtával (Középkorú: 38-45 éves; Idős: 59-74 éves) az SIC-ek amplitúdója középkorú betegek mintáiban $35,15 \pm 12,27$ pA, idős betegek mintáiban $59,8 \pm 19,41$ pA volt. A rise time középkorú betegek mintáiban $273,8 \pm 104,1$ ms, idős betegek mintáiban $173,8 \pm 16,62$ ms volt. A decay time középkorú betegek mintáiban $1413,9 \pm 1087$ ms, idős betegek mintáiban $294,3 \pm 89,11$ ms volt. A SIC-ek frekvenciája középkorú betegek mintáiban $0,38 \pm 0,2$ /min, idős betegek mintáiban $0,17 \pm 0,05$ /min volt. Egyik változás sem mutatkozott szignifikánsnak. (n=29; Oszlopok: átlag \pm SEM.)

A két faj közötti különbségeket megfigyelve és a középkorú populációkat összevetve a humán mintákban a SIC-ek amplitúdója szignifikánsan kisebb volt, ellenben a decay time és a töltésáramlás szignifikánsan nagyobbak bizonyult (22. és 24. ábra). Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a humán mintákban a SIC-ek lassabb kinetikával rendelkeztek, ami (a kisebb amplitúdó ellenére) magyarázatot adhat, hogy az egér mintákhoz képes a humán mintákban szignifikánsan nagyobb töltésáramlást találtunk.

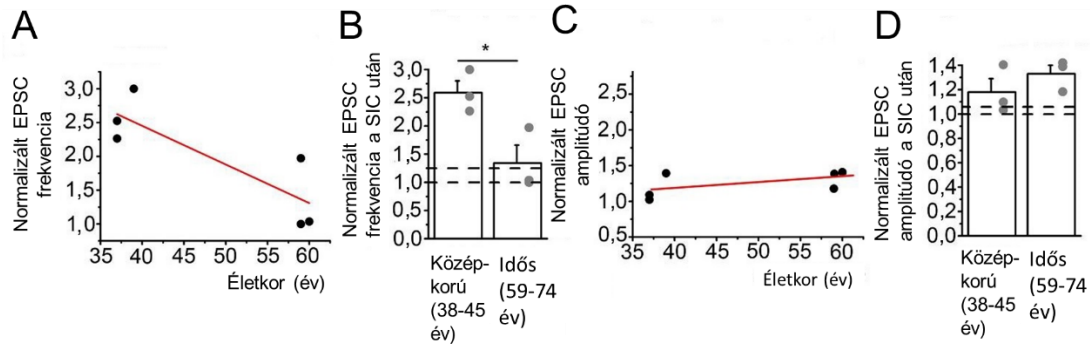
Megvizsgáltuk, hogy a két fajban a SIC-ek szinaptikus plaszticitásra gyakorolt hatása különbözik-e. Egerek esetében az EPSC frekvencia és amplitúdó változásának százalékban kifejezett aránya az életkorral csökkent (25. ábra). Az EPSC frekvencia és amplitúdó abszolút változásai a különböző korcsoportokban csökkenő tendenciát mutattak, de egyik adathalmaz sem mutatott szignifikáns különbséget (25. ábra A-B és D-E).



25. ábra A lassú inward áramok (SIC) szinaptikus plaszticitásra gyakorolt hatása különböző korcsoportokban egér mintákban **A**; Az első SIC utáni EPSC-frekvencia arányát normalizáltuk az első SIC előtti EPSC-k arányával, és az életkor függvényében ábrázoltuk. Fekete pontokkal jelöltük az egyedi mérési adatokat, szaggatott vonallal pedig a fluktuációt ($100\% \pm 25\%$). **B**; A frekvencia változásának abszolút értéke (az egésztől számított normalizált EPSC frekvencia abszolút különbsége) különböző életkori tartományokban (oszlopok: átlag \pm SEM, szürke pontok: egyedi mérési adatok). Szaggatott vonal jelöltük a fluktuáció határát a kontrollban (25%) **C**; **A**, **B** panelen szereplő 0,25-nél nagyobb adatpontok aránya a különböző életkori csoportokban. **D**; Az első SIC utáni EPSC-amplitúdó arányát normalizáltuk az első SIC előtti EPSC-k arányával, és az életkor függvényében ábrázoltuk. Fekete pontokkal jelöltük az egyedi mérési adatokat, szaggatott vonallal pedig a fluktuációt ($100\% \pm 25\%$). **E**; Az amplitúdó változásának abszolút értéke (az egésztől számított normalizált EPSC amplitúdó abszolút különbsége) különböző életkori tartományokban (oszlopok: átlag \pm SEM, szürke pontok: egyedi mérési adatok). Szaggatott vonal jelöltük a fluktuáció határát a kontrollban (6%). **F**; Az **E** panelen szereplő adatpontok aránya a különböző életkori csoportokban.

Ennek a csökkenő tendenciának az aránya az EPSC frekvencia esetén a fiatal korcsoportban 0,8 volt, középkorú csoportban 0,75, míg idős egereknél 0,5 (25. ábra C). Az EPSC amplitúdó aránya fiatal állatokban 0,53, középkorú csoportban 0,5, és idős állatokban 0,25 volt (25. ábra F).

A humán mintákban csak az EPSC frekvencia változásának arányában lehetett csökkenést megfigyelni, az amplitúdónál nem találtunk változást. Ezt az eredményt sajnos befolyásolhatja a tény, hogy 70 éves kor felett a SIC-ek eltűntek, így az EPSC-k paramétereire gyakorolt hatásait sem tudtuk széleskörűen megvizsgálni ($n=6$; 26. ábra).



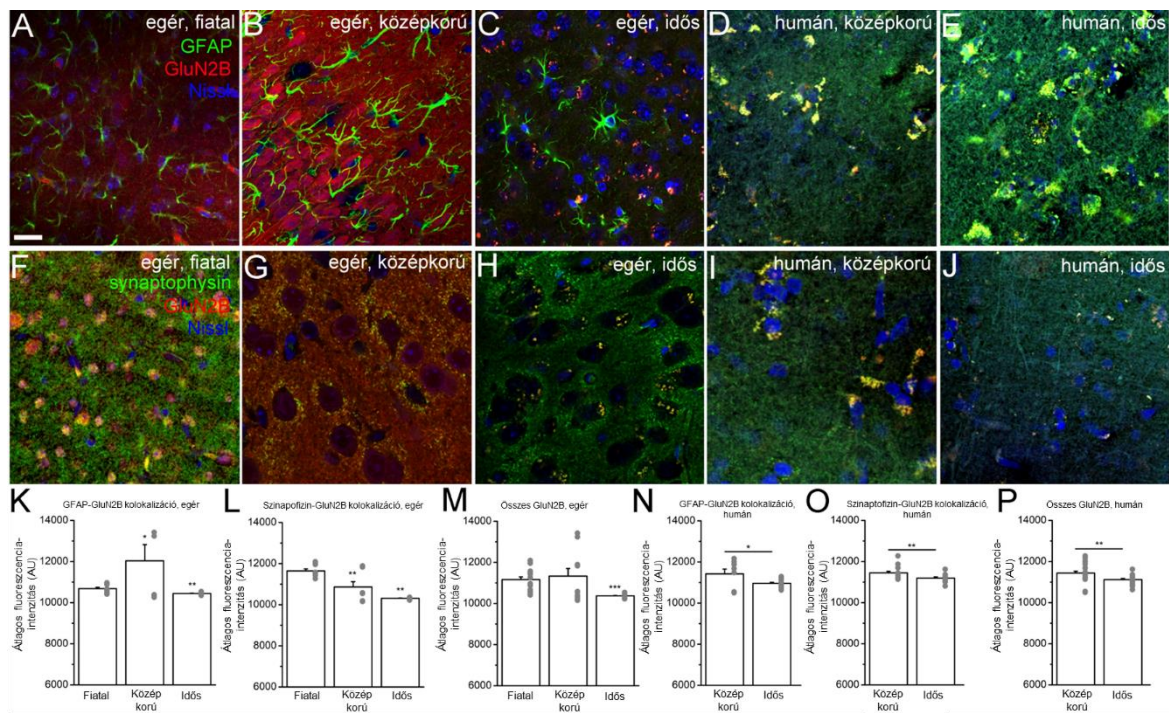
26. ábra A lassú inward áramok (SIC) szinaptikus plaszticitásra gyakorolt hatása különböző korcsoportokban humán mintákban **A**; Az első SIC utáni EPSC-frekvenciákat normalizáltuk az első SIC előtti EPSC-kkel, és az életkor függvényében ábrázoltuk. Fekete pontok: egyéni mérési- és betegadatok, piros vonalak: lineáris illesztés. **B**; Statisztikai összefoglaló a normalizált EPSC-frekvenciáról különböző korcsoportokban (oszlopok: átlag \pm SEM, szürke pontok: egyéni adatok). A szaggatott vonalak $100\% \pm 25\%$ spontán fluktuáció határát jelzik. **C**; Az első SIC utáni EPSC-amplitúdókat normalizáltuk az első SIC előtti EPSC-kkel, és az életkor függvényében ábrázoltuk. Fekete pontok: egyéni mérési- és betegadatok, piros vonalak: lineáris illesztés. **D**; Statisztikai összefoglaló a normalizált EPSC-amplitúdóról különböző korcsoportokban (oszlopok: átlag \pm SEM, szürke pontok: egyéni adatok) A szaggatott vonalak $100\% \pm 6\%$ spontán fluktuációt jelzik. * $p < 0,05$

Amikor az első SIC utáni EPSC-frekvenciákat normalizáltuk a SIC előttiéhez, az életkor-csoportok között egyértelmű csökkenést tapasztaltunk (26. ábra A-B). A normalizált EPSC-amplitúdók esetében a két korcsoport között nem volt szignifikáns különbség (26. ábra C-D).

	Középkorú (38-45 év)	Idős (59-74 év)	p, illesztési paraméterek
<i>Abszolút változás az EPSC - frekvenciában a SIC után</i>	2,59 \pm 0,22	1,34 \pm 0,32	$r^2 = 0,634$; meredekség: -0,057/év p= 0,015
<i>Abszolút változás az EPSC- amplitúdóban a SIC után</i>	1,18 \pm 0,12	1,33 \pm 0,08	$r^2 = 0,11$ and meredekség: 0,008/év p= 0,16

8. táblázat A SIC-ek szinaptikus plaszticitást kiváltó képességének korfüggése humán mintákban

A SIC aktivitás és a SIC-ek szinaptikus plaszticitást befolyásoló képességében bekövetkező változások részben a GluN2B alegység expressziójának megváltozásában keresendő. A középkorú és idős korcsoportba tartozó humán és egér mintákon elvégzett szinaptofizin, és GFAP-val kolonizált GluN2B immunfestés során az idős korcsoportban a fluoreszcencia intenzitásának csökkenését tapasztaltuk (n=2 páciens, 6 egér; 27. ábra).



27. ábra A GluN2B alegység expressziójának változása a szinapszisokban és az asztrociták közelében az életkor előrehaladtával. A-C; Fiatal (14 napos), középkorú (90 napos) és idős (585 napos) egerek neocortexének GFAP festéssel egymásra vetített immunhisztokémiai képei (Zöld: GFAP, piros: GluN2B, kék: Nissl és DAPI) D-E; Középkorú (38 éves) és idős (69 éves) humán neocortexen végzett GFAP festéssel készült immunhisztokémiai összevont képek (Zöld: GFAP, piros: GluN2B, kék: Nissl és DAPI). F-H; Fiatal (14 napos), középkorú (90 napos) és idős (585 napos) egerek neocortexének szinaptofizin festéssel történt, egymásra vetített képei (zöld: szinaptofizin, piros:GluN2B, kék: Nissl és DAPI) I-J; Középkorú (38 éves) és idős (69 éves) humán neocorticalis mintán végzett GFAP festéssel egymásra vetített immunhisztokémiai képei (zöld: szinaptofizin, piros:GluN2B, kék: Nissl és DAPI) K; Statisztikai összefoglaló a GFAP és GluN2B zöld-piros kolokalizációs fluoreszcens jelének fluoreszcencia-intenzitásáról egér mintákban, különböző korcsoportban L; Statisztikai összefoglaló a szinaptofizin és GluN2B zöld-piros kolokalizációs fluoreszcens jelének fluoreszcencia-intenzitásáról egér mintákban, különböző korcsoportban M; Statisztikai összefoglaló az összes GluN2B fluoreszcens jelének fluoreszcencia-intenzitásáról egér mintákban, különböző korcsoportban (oszlopok: átlag ± SEM, szürke pontok: egyedi minták) N; Statisztikai összefoglaló a GFAP és GluN2B zöld-piros kolokalizációs fluoreszcens jelének fluoreszcencia-intenzitásáról humán mintákban, különböző korcsoportban O; Statisztikai összefoglaló a szinaptofizin és GluN2B zöld-piros kolokalizációs fluoreszcens jelének fluoreszcencia-intenzitásáról humán mintákban, különböző korcsoportban P; Statisztikai összefoglaló az összes GluN2B fluoreszcens jelének fluoreszcencia-intenzitásáról humán mintákban, különböző korcsoportban (oszlopok: átlag ± SEM, szürke pontok: egyedi minták) Méretarány minden kép esetében: 20 µm

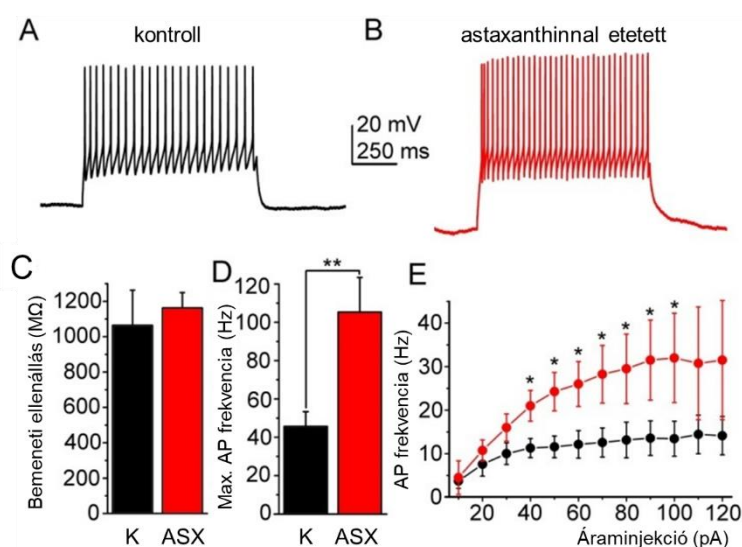
Összefoglalván, egerekben az egyes SIC-ek paraméterei nem változnak az életkor előrehaladtával, de a humán mintákban a töltésáramlásban jelentős csökkenést figyelhettünk meg. Egerekben az alacsonyabb SIC-frekvencia miatt a SIC-ek aktivitása csökkenést mutatott. Ez a csökkenés sokkal látványosabb volt a humán mintákban, de ezt torzíthatta az a tény, hogy egy bizonyos kor fölött a SIC-ek teljesen eltűntek. Mindkét fajban megfigyelhettük, ahogy a SIC-ek szinaptikus plaszticitást befolyásoló képessége csökkent,

de nem azonos módon. Az egerekben az öregedés a SIC-ekre való reakcióképességet befolyásolta, míg humán mintákban a SIC aktivitása bizonyult korfüggőnek.

Az astaxanthin hypothalamusra gyakorolt hatása hosszútávú bevitel esetén

Az astaxanthinnal kevert táppal etetett állatoknál megnövekedett a táplálék felvétele, ezért felmerült a gondolat, hogy az ASX hatással lehet azon agyi területekre, amik a táplálékfelvételt szabályozzák. A hypothalamicus nucleus arcuatusra eset a választásunk, hiszen ez a mag kulcsszerepet játszik a táplálékfelvétel szabályozásában. A hypothalamusból a nucleus arcuatus-t belefoglaló agyszeleteket preparáltunk és patch clamp mérést végeztünk 17 kontroll és 15 ASX-nal etetett egérből.

Először az excitabilitás változásait vizsgáltuk meg (28. ábra A-B). A bemeneti ellenállásban nem találtunk jelentős változást (kontroll: $1065 \pm 200 \text{ M}\Omega$; ASX etetett egér: $1163 \pm 87 \text{ M}\Omega$; $p=0,36$; 28. ábra C). A maximális akciós potenciál tüzelési frekvenciája szignifikánsan nagyobb volt a kontrollnál (kontroll: $46 \pm 8 \text{ Hz}$; ASX után: $106 \pm 18 \text{ Hz}$; $p=0,003$; 28. ábra D). Az átlagos tüzelési frekvencia szintén növekvő tendenciát mutatott az ASX-nal való etetés után (50 pA depolarizációs lépcsőnél kontroll: $11,6 \pm 2,5 \text{ Hz}$; ASX: $24,3 \pm 4,4 \text{ Hz}$; $p = 0,01$; 100 pA depolarizációs lépcsőnél kontroll: $13,4 \pm 4 \text{ Hz}$, ASX: $32 \pm 13 \text{ Hz}$; $p = 0,0037$; 28. ábra E).



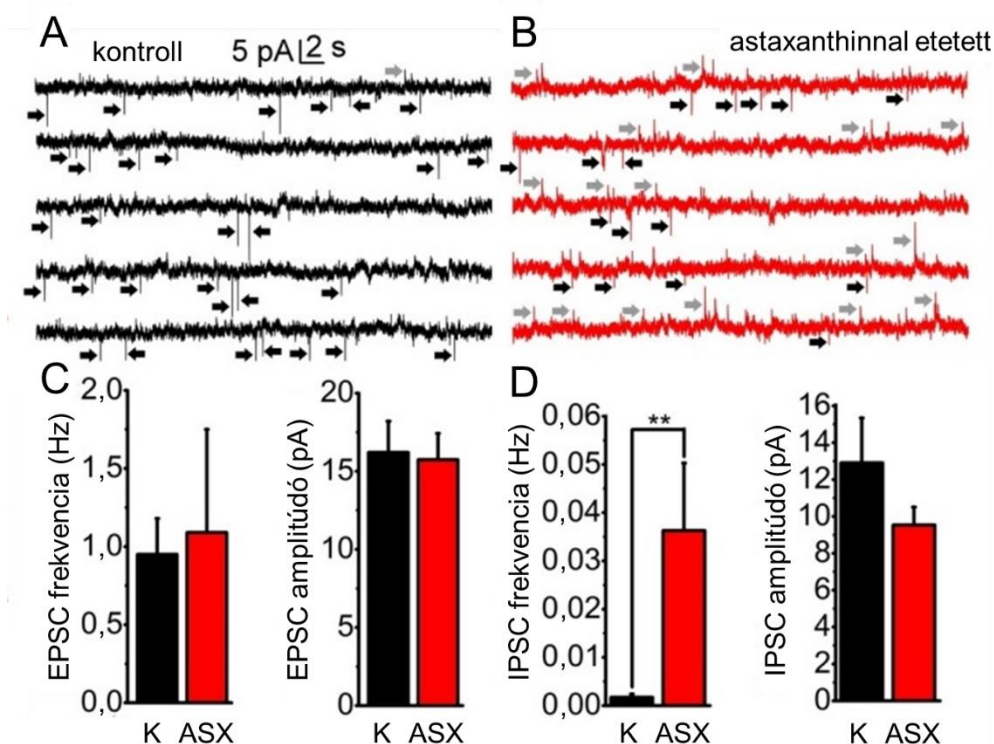
28. ábra Az astaxanthin táplálékkal való bevitelének hosszútávú hatása a hypothalamus nucleus arcuatus neuronjainak excitabilitására A-B; Reprezentatív (120 pA depolarizáló áraminjekcióval kiváltott) áram-clamp felvételek a n. arcuatus mag véletlenszerűen kiválasztott neuronjain kontrollban (A panel; fekete színnel) és astaxanthinnal dúsított (0,02 %) táppal etetett állatokban (B panel; piros színnel). C-E; Statisztikai

összefoglaló a bemeneti ellenállás (C panel), a maximális akciós potenciál tüzelési sebességének (D panel) és az átlagos akciós potenciál tüzelési sebességének változásairól (E panel). Fekete színnel jelöltük a kontrollt (n=5), míg piros színnel az astaxanthinnal etetett állatokat (n=5) (oszlopok: átlag \pm SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

A kísérlet következő lépéseként a spontán excitatórikus és inhibitorikus posztszinaptikus áramokat (EPSC és IPSC) vizsgáltuk meg. Az eredmények alapján elmondhatjuk, hogy az ASX nem változtatta meg az EPSC-k frekvenciáját és amplitúdóját. Érdekes módon az IPSC-k paramétereinek vizsgálatakor azt találtuk, hogy az ASX-nal etetett populációban az IPSC frekvenciája szignifikánsan megnőtt, viszont az amplitúdó nem tért el a két csoportban (29. ábra). Az adatokat a 9. táblázat foglalja össze.

	EPSC frekvencia	EPSC amplitúdó	IPSC frekvencia	IPSC amplitúdó
Kontroll	0,95 ± 0,23 Hz	16,24 ± 2,02 pA	0,0017 ± 0,0007 Hz	12,9 ± 2,4 pA
ASX etett	1,09 ± 0,66 Hz	15,74 ± 1,67 pA	0,036 ± 0,014 Hz	9,53 ± 0,98 pA
p	0,41	0,42	0,003	0,099

9. táblázat Táblázatos összefoglaló az astaxanthinnal (ASX) etetett állatok szinaptikus áramainak változásáról



29. ábra Az astaxanthin táplálékkal való bevitelének hosszútávú hatása a hypothalamus nucleus arcuatus neuronjainak szinaptikus áramaira A-B; Reprezentatív gap-free felvételek a kontrollról (A panel, fekete színű; n=5) és az astaxanthinnal (0,02%) dúsított táppal etetett állatokról (B panel, piros színű; n=10). Az excitatórikus posztszinaptikus áramokat (EPSC) fekete nyíllal, az inhibitorikus posztszinaptikus áramokat (IPSC) szürke nyíllal jelöltük (tartópotenciál: -60 mV). C; Statisztikai összefoglaló az EPSC frekvencia és amplitúdó változásáról. D; Statisztikai összefoglaló az IPSC frekvencia és amplitúdó változásáról (C és D paneleken fekete oszlopok a kontrollt, a piros oszlopok az astaxanthinnal etetett populációt jelölték; oszlopok: átlag ± SEM; ** p < 0,01).

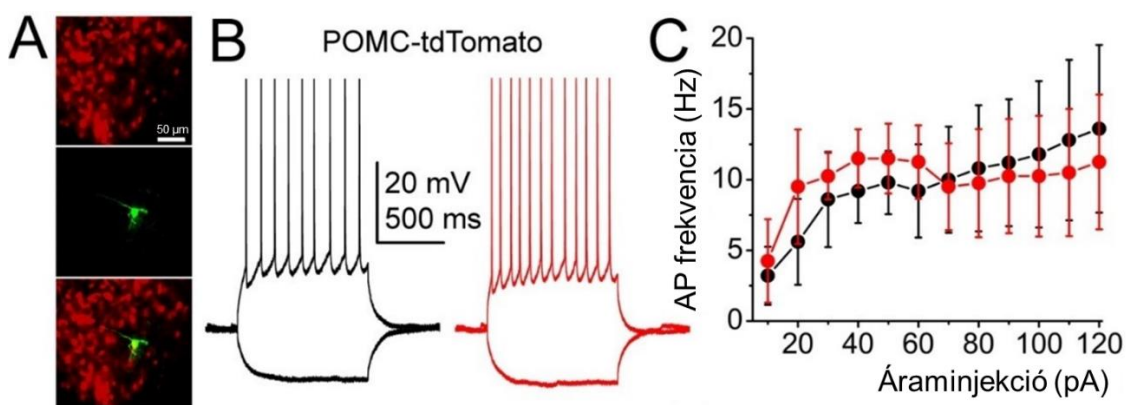
Összefoglalva a fejezetben megfogalmazottakat, az ASX hosszútávú táplálékkal való bevitel fokozta a nucleus arcuatus neuronjainak excitabilitását és növelte a gátló szinaptikus áramok frekvenciáját.

Az astaxanthin akut hatása a hypothalamus neuronjain

A következő kísérletekben az ASX-ra adott akut válaszokat vizsgáltuk a n. arcuatus különböző neuronjain. Megvizsgáltuk a proopiomelanokortin-pozitív neuronok (POMC neuronok) excitabilitását és szinaptikus áramait (n=8). A bemeneti ellenállás, a maximális és átlagos tüzelési sebesség sem különbözött szignifikánsan a kontroll és az ASX alkalmazása között (10. táblázat, 30.ábra).

	Bemeneti ellenállás (MΩ)	Max. AP frekvencia (Hz)	Átlagos AP frekvencia (50 pA depol. lépcső; Hz)	Átlagos AP frekvencia (100 pA depol. lépcső; Hz)
kontroll	515,5 ± 59,74	42,68 ± 9,63	9,8 ± 2,25	11,8 ± 5,18
ASX	667,33 ± 112,2	42,85 ± 10,69	11,5 ± 2,46	10,25 ± 4,07
p	0,12	0,45	0,31	0,41

10. táblázat Táblázatos összefoglaló az astaxanthin POMC neuronok excitabilitására gyakorolt hatásáról (n=8 neuron)



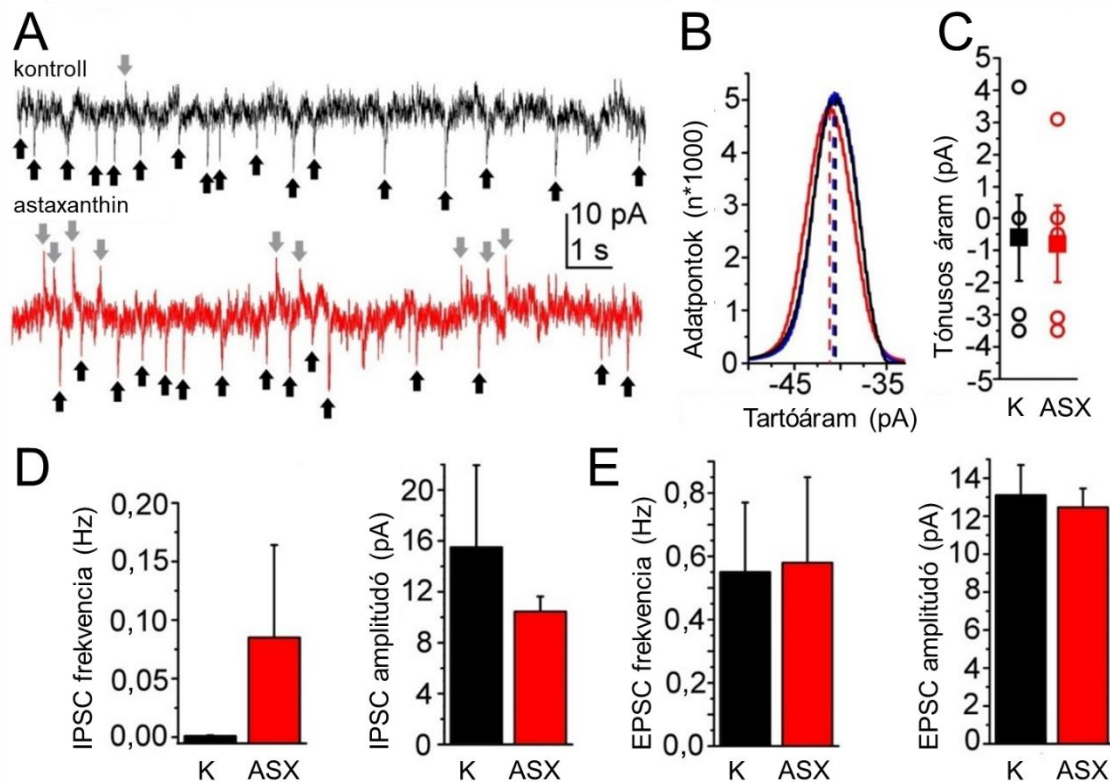
30. ábra Az astaxanthin akut alkalmazásának hatásai a nucleus arcuatus POMC neuronjainak excitabilitására **A**; A neuronális típusok megkülönböztetése. Felső kép: POMC-pozitív sejtek által expresszált tdTomato fluoreszcens marker (piros). Középső kép: a patch-clamp mérés során biocitinnel feltöltött neuron (zöld). Alsó kép: a felső és középső képek egymásra vetített felvétele. Mindhárom kép ugyanazon 1 μm vastag konfokális rétegfelvétel látható (Méretarány: 50 μm). **B**; Reprezentatív áram-clamp mérések POMC neuronokon kontroll körülmények között (fekete) és 2,5 μM ASX alkalmazása után (piros). **C**; Az átlagos tüzelési sebesség összehasonlítása különböző depolarizációs lépések alkalmazásával kontroll körülmények között (fekete; n=8) és ASX kezelés során (piros; n=8).

Az ASX hatására kialakuló tónusos áramokat is megvizsgáltuk. -60 mV-os tartópotenciálon a tartóáram spontán fluktuációja $-0,6 \pm 1,35$ pA volt, míg az ASX alkalmazása $-0,8 \pm 1,19$ pA tónusos áramot váltott ki ($p=0,46$), de ez nem bizonyult szignifikánsnak (31.ábra A-C).

Hasonlóan a hosszútávú etetéses kísérlethez megvizsgáltuk az ASX akut kezelésének hatását a szinaptikus áramok változására ($n=18$). Az EPSC-k frekvenciája és amplitúdója nem változott, viszont az IPSC-k frekvenciája az ASX kezelés hatására megnőtt, viszont nem volt szignifikáns. Ennek legvalószínűbb oka az lehetett, hogy egy esetben nem jelent meg IPSC a kontrollban, viszont ASX hatására 0,402 Hz-es frekvenciával IPSC-k jelentek meg. Másik 4 esetben enyhébb emelkedés volt megfigyelhető, és találtunk 3 olyan gap-free felvételt, ahol sem kontrollban, sem ASX hatására nem jelentek meg IPSC-k. A hatás erősségének ezen ingadozása miatt csak emelkedő tendencia rajzolódott ki, de nem volt szignifikáns. ASX hatására az IPSC-k amplitúdója nem változott szignifikánsan (11. táblázat, 31. ábra D-E).

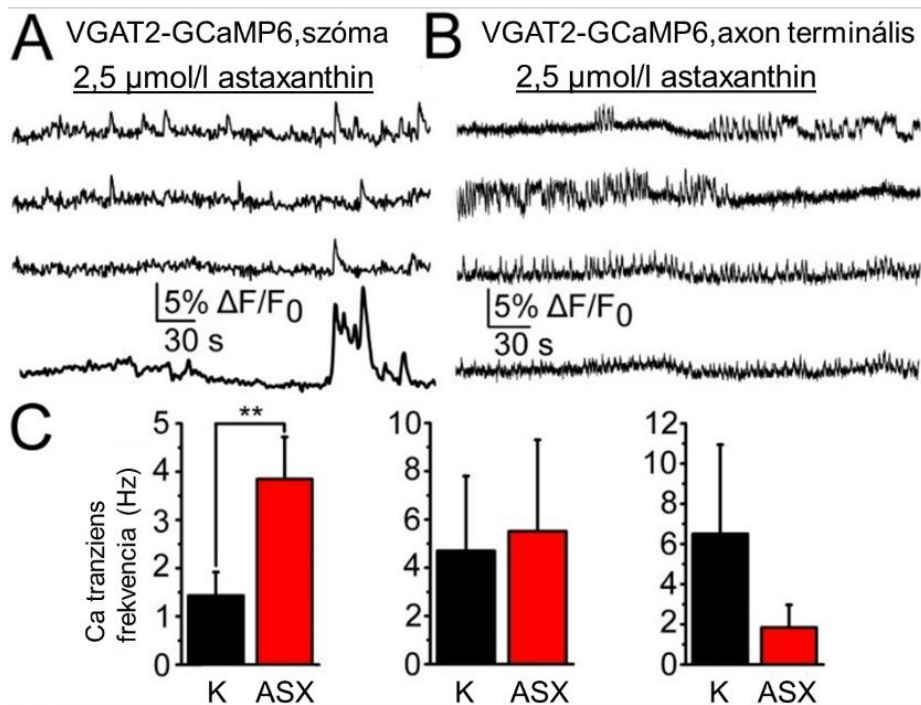
	EPSC frekvencia (Hz)	EPSC amplitúdó (pA)	IPSC frekvencia (Hz)	IPSC amplitúdó (pA)
kontroll	$0,55 \pm 0,21$	$13,07 \pm 1,57$	$(0,001 \pm 0,0006$	$15,55 \pm 6,45$
ASX	$0,58 \pm 0,27$	$12,46 \pm 1,05$	$0,086 \pm 0,079$	$10,45 \pm 1,19$
p	0,46	0,37	0,158	0,19

11. táblázat Táblázatos összefoglaló az astaxanthin POMC neuronok szinaptikus áramainak változására gyakorolt akut hatásáról a nucleus arcuatusban ($n=18$).



31. ábra Az astaxanthin akut alkalmazásának hatásai a nucleus arcuatus POMC neuronjainak szinaptikus és tónusos áramaira **A**; Reprerentatív gap-free felvételek 2,5 μ mol/l astaxanthin akut hatásáról (kontroll: fent, fekete; n=18; ASX: lent, piros; n=18). Az excitatórikus posztzinaptikus áramokat (EPSC) fekete nyilakkal, míg az inhibítórikus, posztzinaptikus áramokat (IPSC) szürke színű nyilakkal jelöltük mindkét felvételen (tartópotenciál: -60 mV). **B**; Az A panelen feltüntetett reprezentatív felvételek tartóáramáról készült hisztogram elemzés (színjelölés az A panelen leírtak szerint). **C**; A tartóáram spontán fluktuációja kontroll körülmények között (fekete) és ASX hatására (piros) (üreges körök: egyedi mérési adatok, kitöltött négyzetek: átlag \pm SEM). **D**; Statisztikai összefoglaló az ASX IPSC frekvenciájára (bal) és amplitúdójára (jobb) gyakorolt hatásáról (színjelölés az A panelen leírtak szerint). **E**; Statisztikai összefoglaló az ASX EPSC frekvenciájára (bal) és amplitúdójára (jobb) gyakorolt hatásáról (színjelölés az A panelen leírtak szerint; oszlopok: átlag \pm SEM).

Ezt a kísérletsorozatot folytatva az ASX GABAerg neuronokra és szinapszisokra gyakorolt hatását vizsgáltuk. VGAT2-GCaMP6f (lásd anyagok és módszerek fejezet) kalciumindukátort expresszáló sejteket felhasználva összesen 22 olyan ROI-t találtunk, amik kalcium tranzienseket mutatott. Az ASX akut alkalmazása a ROI-k 77,3 %-ában megnövelte a kalcium tranziensek gyakoriságát, vagy kiváltotta a tranzienseket. 9,1 %-ban nem befolyásolta a sejtek aktivitását, és a maradék 13,6%-ban csökkentette, vagy megszüntette a kalcium tranzienseket (32.ábra).



32. ábra A nucleus arcuatus GABAerg neuronjainak kalcium tranziensei és az azokban bekövetkező változások A-B; Reprezentatív átlagos kalcium imaging felvételek négy GABAerg neuron szómájáról és axon terminálisáról kontroll körülmények között és 2,5 μmol/l astaxanthin alkalmazásakor. **C;** Statisztikai összefoglaló a GABAerg neuronok szómájának kalcium tranziens frekvenciájáról kontroll körülmények között (fekete) és astaxanthin alkalmazásakor (piros). Az ASX akut alkalmazása a neuronok 77,3 %-ában megnövelte a kalcium tranziensek gyakoriságát (bal oldal; ** $p < 0,01$), vagy kiváltotta a tranzienseket. 9,1 %-ban nem befolyásolta a sejtek aktivitását (középen), és a maradék 13,6%-ban csökkentette, vagy megszüntette a kalcium tranzienseket (jobbra).

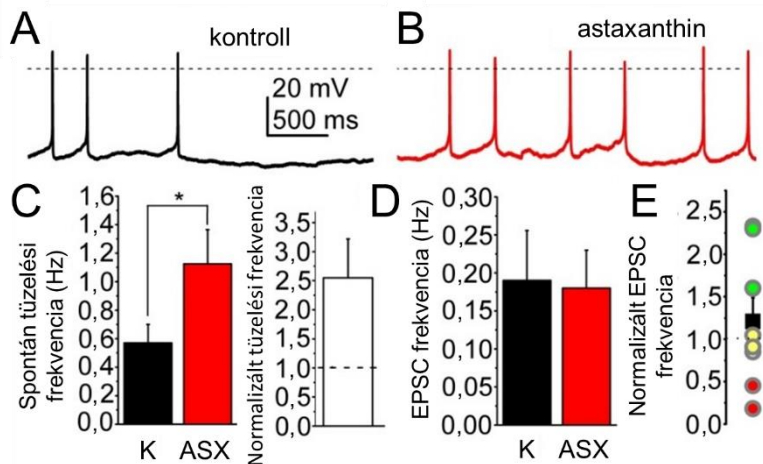
Ehhez kapcsolódóan a kisebb ROI-k (valószínűleg a GABAerg neuronok axon terminálisai) is hasonló választ adtak ASX alkalmazásakor. A kalcium-tranziens aktivitása a 8 vizsgált régióból 3 régióban csökkent, vagy teljesen megszűnt. A további 5 ROI-ban a kalcium-tranziens aktivitása növekvő tendenciát mutatott. Az átlagos kalcium-tranziens frekvenciája $2,42 \pm 0,78$ Hz volt, ami ASX alkalmazásának hatására $3,73 \pm 0,75$ Hz-re nőtt (ez összességében $3,27 \pm 1,57$ szerez növekedés). A kalcium-tranziens frekvenciájának csökkenése miatt azonban egy kisebb populációban a kalcium-tranziens frekvenciája nem mutatott szignifikáns növekedést ASX adása után ($p=0,11$; 32. ábra C).

A GABAerg neuronok spontán akciós potenciálok tüzelési sebessége $0,57 \pm 0,13$ Hz volt, ami ASX hatására $1,12 \pm 0,24$ Hz-re nőtt (ez $2,55 \pm 0,67$ -szeres növekedés; $p=0,036$; $n=10$; 33. ábra A-C). A szinaptikus áramokat és azok változásait is elemeztük, és nem találtunk szignifikáns különbséget a GABAerg neuronok EPSC-frekvencia és amplitúdó változásában

(12. táblázat, 33. ábra D-E). Három esetben az EPSC frekvenciája 1,62,3-szoros növekedést mutatott, de az EPSC amplitúdó változása csak $1,21 \pm 0,28$ -szoros volt (33. ábra E).

	EPSC frekvencia (Hz)	EPSC amplitúdó (pA)
kontroll	$0,19 \pm 0,06$	$12,54 \pm 1,45$
astaxanthin	$0,18 \pm 0,05$	$13,12 \pm 1,55$
p	0,44	0,38

12. táblázat Táblázatos összefoglaló a GABAerg neuronok szinaptikus áramainak változásáról astaxanthin hatására (n=10)



33. ábra A nucleus arcuatus GABAerg neuronjainak spontán tüzelési frekvenciája és a szinaptikus áramainak változásai. A-B; Reprezentatív áram-clamp felvételek a GABAerg neuronok spontán aktivitásáról kontroll körülmények között (A panel, fekete) és $2,5 \mu\text{mol/l}$ ASX hatására (B panel, piros). C; Statisztikai

összefoglaló a spontán és normalizált tüzelési frekvenciának kontrollban (fekete) és ASX mellett (piros) (n=10). D; A GABAerg neuronok EPSC-frekvenciájának statisztikai összefoglalója kontroll körülmények között (fekete) és ASX alkalmazásakor (piros). E; Az EPSC-frekvencia átlagos változása (fekete négyzet) és az egyes frekvencia-változások (zöld: növekedés; piros: csökkenés; sárga: nincs változás; * $p < 0,05$).

A fenti eredmények alapján feltételezhetjük, hogy az ASX közvetlenül a nucleus arcuatusban lévő GABAerg neuronok excitabilitását növeli, azonban az sem kizárható lehetőség, hogy valójában a GABAerg neuronok excitatórikus hatása növekszik meg.

Összefoglalva az ebben a fejezetben leírtakat, a POMC neuronok szuppressziója és a GABAerg neuronok megnövekedett aktivitása összhangban van arra nézve, hogy megnövekedett a táplálékfelvétel astaxanthin hatására.

Megbeszélés

Ezen doktori értekezésben leírtakkal bizonyítottuk, hogy az eddigi, egér agyban talált eredményekhez hasonlóan, a SIC-ek jelen vannak az emberi agyban is. Bemutattuk, hogy ezen események különböznek az egér mintákban található SIC-ektől. Az egerekkel ellentétben a humán SIC-ek töltésáramlása nagyobb, ami főként a középkorú populációban volt megfigyelhető, mivel itt voltak a legnagyobb eltérések a kinetikai paraméterekben a két faj között. A kísérleteinkben az találtuk, hogy a SIC-ek az esetek nagyjából felében képesek időzítésfüggő módon befolyásolni az serkentő szinapszisok erősségét. Ez az egér mintákban éppúgy megvan, mint humán minták esetében, sőt életkorfüggést is mutatnak. Az egerekben a SIC-ek nagysága és kinetikája nem csökken az életkorral, ezzel szemben a frekvenciájuk és a szinaptikus erősséget befolyásoló hatásuk idősebb korban csökken. Emberekben az életkorral a SIC-ek területe és kinetikája, valamint a frekvenciájuk is csökken. A legérdekesebb, hogy 70 éves kor felett a SIC-ek teljesen eltűntek.

A humán és egér SIC-ek különböznek

Az emberi SIC-ekben - összehasonlítva az egérben mérhetőkkel – jelentősen nagyobb a töltésáramlás, de az amplitúdó jellemzően kisebb, mint egér mintákban. A humán mintákban a SIC paraméterek erős korfüggést mutattak, ezért a középkorú egér és humán populációkat összehasonlító elemzésnek vetettük alá, és míg az egereknél a SIC-ek lassabb kinetikát mutattak, addig a humán mintáknál a SIC-ek amplitúdója jelentősen kisebbnek bizonyult. Nincs kizárva annak a lehetősége, hogy az eltérő szövetszállítás és kezelés miatt találtuk a humán mintákban a SIC-ek amplitúdóját kisebbnek, de a kinetikai paraméterek egyértelműen faji különbözőséget mutattak.

Ezekért a különbségekért nagy valószínűséggel az asztrociták glutamát felszabadulása és az extraszinaptikus NMDA-receptorokhoz való diffúziójuk a felelős. A glutamát diffúziójának a sebessége befolyással lehet az extraszinaptikus NMDA -áramokra. A lassabb glutamát diffúzió megváltoztathatja az áramok kinetikai tulajdonságait, sőt a rágesálókban a SIC-ek tónusos áramokká is módosulhatnak (51,175). A glutamát diffúziója - a szöveti geometria és annak összetettsége miatt - szintén eltérő lehet egérben és humán mintákban. A humán asztrocitáknak morfológiailag több típusa különböztethető meg, és emiatt a folyamatok lényegesen összetettebbek és szerteágazóbbak (4,260–262).

A SIC-ek szinaptikus erősséget befolyásoló képessége

Fiatal rágsálók hippocampusában, amikor a posztszinaptikus tüskét rövid időn belül (kb. 0-20 ms) megelőzi a preszinaptikus aktivitás, akkor LTP alakul ki. Ha a posztszinaptikus tüske jön először, és utána a preszinaptikus (kb. 0-100 ms), akkor LTD alakul ki (157,263). Felnőtt, humán hippocampusban az LTD-LTP mintázat időbelisége viszont érdekes módon eltér, eltolódik ettől. Ha a posztszinaptikus tüske és a preszinaptikus ingerlés közötti időkülönbség nagyobb volt, mint 80 s, akkor LTD alakult ki, ettől kisebb időkülönbség esetén LTP formálódott (172). A fiatal rágsálók hippocampusát és az emberi temporalis cortexet összehasonlítva, a humán mintákban fordított kapcsolatot találtak a preszinaptikus ingerlés és a posztszinaptikus tüskék időzítése és időbeli csúszása között. Amikor a posztszinaptikus tüskék megelőzték a preszinaptikus jelet, akkor LTP alakult ki, míg LTD esetében ez fordítva történt (263,264).

Az LTP és LTD kialakulásának körülményeit szabályozó tényezők hátterében valószínűleg az intracelluláris kalcium jelek állhatnak, pontosabban azok időbeli hossza és időzítése más eseményekhez képest. Az, hogy az ic. kalcium hogyan változik több mechanizmustól függ: befolyással van rá a metabotróp glutamát és az NMDA receptorok aktivitása, valamint a feszültségvezérelt kalcium csatornák működése (157,164,265,266).

Egyre jobban elfogadott és egyre szélesebb körben elterjedt az elmélet, miszerint az asztrociták képesek befolyásolni a hosszútávú szinaptikus plaszticitást (267). Fiatal egereknél a hippocampus mintákban az LTD-t indukáló protokoll – a posztszinaptikus akciós potenciál megelőzi a preszinaptikus tüskét – felnőtt egerekben már LTP-t vált ki. Ezért a változásért, valamint a felnőtt egerekben kialakuló LTP-kért az NMDA receptorok a felelősek, viszont ugyanúgy szerepe van az mGluR-ok aktivációjának is. Az asztrocita oldaláról szükség volt az LTP-hez az aktivációból következő adenzin és glutamát felszabadulására (268). A fiatal egyedekben előforduló LTD-t egy hónapos életkor után az asztrociták aktivációja során felszabadult adenzin gátolni fogja. Ezzel együtt a felnőtt egerekben a glutamát receptorokon keresztül (NMDA és mGluR) az asztrociták LTP-t váltanak ki (167).

A gliasejtek funkciójának gátlásával együtt a hosszú távú szinaptikus plaszticitás is megváltozhat. Az egér hippocampus minták HFS-el kiváltott LTP mértéke csökkent L- α -aminoadipát (L-AA) hatására. Ezen gliotoxin hatása visszafordítható volt D-szerint alkalmazásával (269). Amíg hippocampusban HFS-val LTP-t, addig LFS-val LTD-t lehet

kiváltani. Az L-AA az LTP mellett képes volt csökkenteni az LTD-t, bár kisebb mértékben. Az L-AA-hoz hasonlóan az amiloid β 1-42 ($A\beta_{1-42}$) is csökkentette az LTP mértékét, és hatására az LTD-t kiváltó stimulációs protokoll végén LTD helyett LTP alakult ki. $A\beta_{1-42}$ és az L-AA együttes alkalmazásakor az L-AA már nem tudta tovább csökkenteni az LTP mértékét, de az $A\beta_{1-42}$ hatására az LTP-vé alakult LTD visszaalakult (270). Összefoglalva a fent leírtakat, a gliasejtek kémiai úton történő gátlása befolyással lehet a hosszútávú szinaptikus plaszticitásra, tehát a gliasejtek (azon belül az asztrociták) fontos szerepet játszanak a szinaptikus plaszticitás kialakításában.

Az asztrociták szerepét vizsgálva kísérletben bizonyították, hogy az asztrociták közötti gap junction kapcsolatokat megszakítva a kiváltott LTP is szignifikánsan csökkent (271). Az egerek szomatoszenzoros kérgében az asztrociták által szabályozott LTP és az asztrociták kalcium-jelátvitelle csökkenést mutatott az Alzheimer modellben (272). A kognitív hanyatlás viszont megakadályozható idősebb egerekben, az IP3 knock-out egereknél az asztrociták kalcium-jelátvitelle megváltozott, valamint az asztrociták aránya és dendritek száma is eltért a vad típusú egerekhez képest. Az IP3KO egerek ezáltal sokkal jobban teljesítettek a kognitív feladatokban, mint vad típusú társaik (273).

Az NMDA-függő LTD-t módosíthatja az asztrociták glutamát felvételének változása egér hippocampusban (274). Az asztrociták modulálhatják az LTP-t glutamát felszabadítása révén, illetve a GluN2A alegységet tartalmazó NMDA receptorok aktiválásával (275). Egér striatumban az EAAT2 glutamát transzporter gátlása a kiváltott STDP-ben változást okozott, a plaszticitás mintázata szabálytalanná vált, ami az extraszinaptikus NMDA receptorok aktiválása miatt vált rendellenessé (276).

Néhány nemrégiben megjelent, *in vivo* egérmodelleket használó tanulmányban kimutatták, hogy az asztrociták egyedül is képesek hosszú távú szinaptikus plaszticitást kiváltani. Az asztrociták *in vivo* aktiválásával kiváltott LTP hozzájárult a tanuláshoz és az emlékek felidézéséhez (258). Az asztrociták optogenetikai módszerrel való aktiválása csak a channelrhodopsin 2 (ChR2) ionotróp csatorna nyílásával tudott LTD-t kiváltani, míg LTP-t a metabotróp Opto-a1AR tudtak kiváltani (277). Egér striatumban az agykérgi HFS-vel aktivált asztrocitákban megnövekedett a kalcium szintje, ami adenzin felszabaduláshoz vezetett. Ez az adenzin az A1R receptoron keresztül képes LTD-t kiváltani. Az LTD ezen formájához nem szükséges neuronális esemény, viszont ez az asztrocita-függő LTD nem nyomja el a neuronális LTD kialakulását (278).

Ezen munkában bebizonyítottuk, hogy a SIC-ek nagyjából a szinapszisok felében képesek STDP-t kiváltani, amik megfelelnek az anti-Hebb szabálynak. Valószínűleg az eredményeink azért nem követik a klasszikus, Hebb-féle szabályt (vagyis amikor a preszinaptikus ingerlés megelőzi a posztszinaptikus akciós potenciált, akkor LTP alakul ki), mert az általunk használt protokoll sem a hagyományos protokollok közé tartozik. Tipikusan az STDP kísérletekben rövid, ismétlődő (10-300 alkalom) stimulusokat használnak (157,265,266). A SIC-ek, amiket mi posztszinaptikus jelnek tekintettünk, időben elhúzódtak, ami miatt az akciós potenciálnál jóval nagyobb, 1-634 pC töltésáramlást mértünk. A posztszinaptikus sejtekben az NMDA-receptorokon és feszültségfüggő csatornákon keresztül beáramló kalcium és az így megnövekedett intracelluláris kalcium koncentrációja nagy valószínűséggel hatalmas szereppel bír az STDP-k kialakulásában (265). Éppen ezért úgy gondoljuk, hogy a preszinaptikus stimulációval egy időben érkező SIC az intracelluláris kalcium szintjének megnövekedésével jár, ami LTP kialakulásához vezethet, amennyiben a SIC megelőzi, vagy egyszerre jelenik meg az EPSC-vel. Amikor az SIC -ek a kiváltott EPSC után alakultak ki, valószínűleg csak egy kezdeti kisebb és lassabban formálódó kalciumszint emelkedés történik az STDP időablakában. Ez az enyhe emelkedés a kalcium koncentrációban LTD-hez vezetnek (265).

A humán mintákon végzett kísérleteink alapján felmerül a gondolat, hogy a SIC-ek emberekben is képesek szinaptikus plaszticitást kiváltani. Mivel spontán, azaz ép lokális hálózatok működésének következményeiként létrejövő eseményeket rögzítettünk és elemeztünk, sajnos nem lehet kizárni annak a lehetőségét, hogy a SIC-eknek nem a monoszínaptikus hatásait figyelhettük meg, hanem egy egész neuronpopulációra gyakorolt hálózati hatását, ami az egész hálózat excitabilitását növelte. Ha feltételezzük, hogy a kísérleteinkben a szinapszisokra gyakorolt hatást láttunk és nem hálózati hatást, akkor azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a humán SIC-ek szinaptikus plaszticitásra gyakorolt hatása eltér a rágcsálókban találtaktól, mivel csak a frekvencia és amplitúdó emelkedést találtunk, de szupressziót nem. Ennek egyik oka lehet az, hogy az egér és humán STDP ismerten különböznek (263). Másik eshetőség, hogy a humán SIC-eknek nagyobb és hosszabb a töltésáramlásuk, mint egerekben. A humán SIC-eknek nagyobb a töltésáramlása, de lassabb a kinetikája, ami hatással lehet a szinaptikus plaszticitást szabályozó szerepükre, mivel időben hosszabb és lassabb növekedést okoznak a szomatodendritikus intracelluláris kalcium koncentrációban. A különböző kalciumjelek differenciáltan befolyásolják az időzítésfüggő plaszticitást (157,265,266). Ez megmagyarázhatja a plaszticitás öregedésével

kapcsolatos eredményeinket: a SIC-ek életkorfüggést mutattak egér és humán mintákban, illetve a két faj között is különbségeket találtunk (lásd később).

Az öregedés befolyásolja a SIC-eket és a szinaptikus erősség SIC-függő változásait

Az asztrociták számos morfológiai és funkcionális változáson mennek keresztül az öregedésük során, viszont a kutatóknak nincs közös álláspontjuk arra vonatkozóan, hogy a GFAP-pozitív sejtek száma hogyan változik. Több kutatás azt találta, hogy az öregedéssel megnőtt az asztrociták száma egér hippocampusban (279–283), neocortexben (281–284), valamint emberi hippocampusban és striatumban (280,283,284). Ezzel szemben más asztrocita markerek, mint a glutamin-szintetáz és az S100B alig mutatott változást az öregedés során az egerek hippocampusában (285). Érdekes módon az asztrociták morfológiáját érinti az öregedés folyamata. Egerek és főemlősök hippocampusában az asztrociták elágazásainak hossza és a végződés komplexitása fiatal korban nő, felnőtt korban eléri maximumát, majd idős korban csökken (286,287). Az asztrociták elágazásainak térben elfoglalt mérete csökken, így az asztrocita domének is csökkentek az életkorral (287).

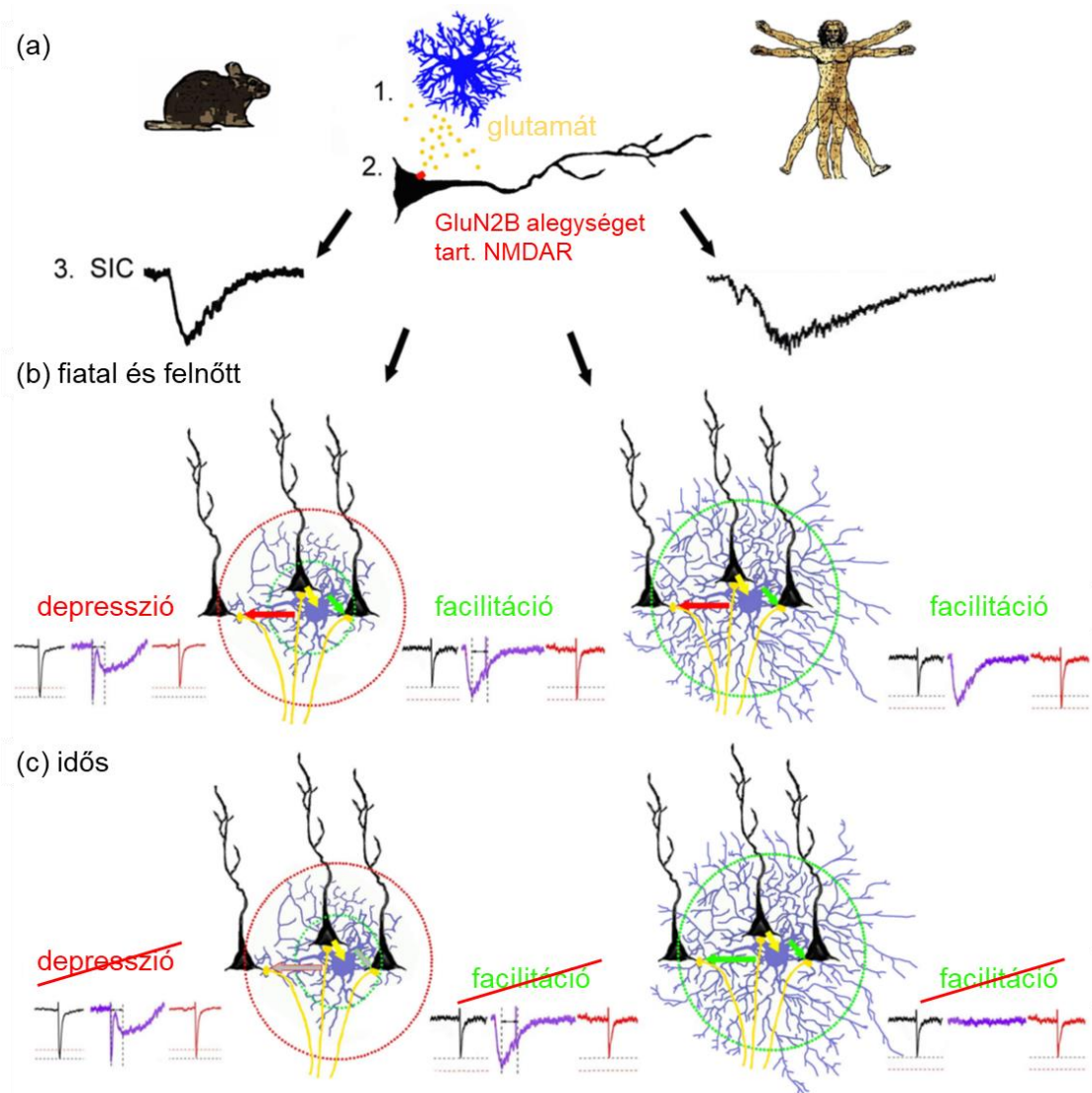
Az asztrociták öregedésének funkcionális változásai az egyedi kalcium oszcillációk paramétereiben nem találtak csökkenést, de azon asztrociták száma csökkent, amik oszcillációval rendelkeztek (288). Az öregedéstől függetlenül az asztrociták a neuronális ingerekre továbbra is válaszolnak, mivel az egér hippocampusban és neocorticalis mintákban különböző receptorok működésének következtében az öreg asztrociták aktiválódnak. Ezen receptorok közé tartoznak az ionotrop és metabotrop glutamát receptorok, P2X és P2Y receptorok. Ezen felül az öreg asztrociták aktiválódnak a proteáz-asszociált receptor 1 (PAR-1) agonista, acetilkolin, noradrenalin és kannabinoidok hatására (288–290). Ugyanakkor az mGluR5 által közvetített jelátvitel csökkent humán és egér hippocampusban és neocortexben, de ez valószínűleg annak a következménye, hogy az mGluR5 expresszió általánosan csökken idős korban (288,291).

Az asztrocitáknak a szinaptikus funkciókat befolyásoló képessége is változik az életkorral. Az öregedés során a SIC-eknél figyelembe kell venni néhány tényezőt. Ilyen szempont az a) kalcium-excitabilitás és azon asztrociták száma, amik rendelkeznek kalciumhullámokkal, b) az asztrociták glutamát felvétele és felszabadítása, c) az asztrocitától a glutamát diffúziója az extraszinaptikus NMDA receptorokhoz, és d) azon extraszinaptikus NMDA receptorok száma, amiket aktiválni lehet.

- a) Gómez-Gonzalo és mtsai kimutatták, hogy az asztrociták kalcium excitabilitása idős korban nem változik jelentős mértékben, de a reakcióképes asztrociták száma csökken (288). Ez a mi eredményeinkkel egybehangzó lehet, hiszen a SIC-ek frekvenciája az életkorral csökkent. Ezt a változást okozhatja azon reakcióképes asztrociták számának csökkenése, amik képesek SIC-eket kiváltani.
- b) Rágcsálók hippocampusában az EAAT1 és EAAT2 glutamát transzporterek száma is csökken az életkorral. Ezek az asztrocita-specifikus transzporterek szükségesek ahhoz, hogy a glutamátot felvéve csökkentsék az extracelluláris glutamát koncentrációt. Ennek lassulása a transzporterek csökkenő száma miatt rontja a szinaptikus transzmissziót (292). Fiatal korban a glutamát transzporterek expressziója nő, felnőttkorban eléri a maximumot, majd idős korban csökkenés tapasztalható (293). Az életkorral együtt változó transzporterek száma hasonló mintázatot követ, mint egyes SIC paraméterek: a SIC aktivitása az életkorral csökkent mind az egér, mind a humán mintákban.
- c) A glutamát diffúziós tulajdonságai már régóta ismertek. Az extracelluláris térben diffundáló glutamát által kiváltott neuronális áramokra befolyással van a glutamát által megtett út komplexitása (261,262). Az életkorral együtt az asztrociták által befolyásolt folyamatok összetettsége és az asztrocita domének mérete csökken, és ez valószínűleg hatással van a diffúziós pályákra is. A diffúziós pályák szöveti komplexitásának csökkenése valószínűleg gyorsabb extraszinaptikus neuronális eseményeket eredményez, ami összhangban van azzal az eredményünkkel, miszerint a SIC-ek idősebb korban gyorsabbá válnak (286,287).
- d) Az NMDA receptorok expressziója, funkciói és összetétele is változik az életkor előrehaladtával. Idős korban a kognitív funkciók hanyatlásával összefüggésben az NMDA receptorok alulműködését fedezték fel, valamint az NMDA receptorokon keresztül is csökken a kalcium beáramlása a sejtekbe (294,295). Rágcsálókban az életkorral az extraszinaptikus NMDA receptorok expressziója megnövekedett (296), ugyanakkor összetétele életkorfüggően változik (85). Az NMDA receptorok alegység összetételéről tudjuk, hogy a GluN2B alegység újszülöttekben dominál, majd az életkorral az alegység mennyisége csökken és a GluN2A alegység veszi át a helyét, így a GluN2A/GluN2B arány megnő az életkorral rágcsálókban (297,298), és emberekben (299).

Nagyrészt megerősítettük az irodalomban az egér öregedésről közölt, eddig megjelenő korábbi adatokat, miszerint az egyedi SIC-eket nem befolyásolja az öregedés, és habár a SIC-ek rágszálókban nem tűntek el az életkorral, de a frekvencia csökkent, ami összhangban van az eddig közöltekkel (288). Emberek esetében viszont a SIC-ek paraméterei nem követik az egerekben találtakat. A töltésáramlás és a kinetikai paraméterek jelentősen csökkentek a humán mintákban és a SIC-aktivitás 70 éves kor felett teljesen megszűnt. Ennek egyik oka lehet az asztrociták glutamáttal kapcsolatos életkorfüggő változásai. A glutamát felvétel, illetve a glutamát felszabadítása, továbbá a neuronok extraszinaptikus NMDA receptorok expressziójának, funkciójának és összetételének megváltozása mind felelősek lehetnek a SIC-ek eltűnéséért (292,293,297–299).

A szinaptikus plaszticitásra eltérő hatással voltak a SIC-ek a két faj esetében. Egerekben a szinaptikus plaszticitást életkorfüggő módon befolyásolják a SIC-ek. Ennek több lehetséges oka is lehet, például az mGluR5 jelátvitelének csökkenése, vagy az NMDA-receptorok életkorfüggő változásai. Humán minták esetében viszont nem csak a szinaptikus plaszticitás, de maga a SIC is érintett. Ebben több tényező is közrejátszhat, mint például hogy az életkorral változik az asztrociták glutamát felvétele, vagy felszabadítása, valamint a neuronális NMDA-receptorok összetételének életkorfüggő változása. Kimutattuk, hogy a GluN2B alegység sűrűsége enyhén, de szignifikánsan csökkent, ami hatással lehet a szinaptikus plaszticitás SIC-ekre, illetve azok aktivitására való érzékenységre. A visszafogott csökkenés miatt feltételezhetjük, hogy más befolyásoló tényezők is befolyással lehetnek a SIC-ek által modulált szinaptikus plaszticitásra. Ezen megfigyeléseink a két faj agyi öregedésének jelentős különbségeit vetítik előre (34.ábra).



34. ábra A SIC-ek szinaptikus plaszticitásra gyakorolt hatásainak összefoglalása (a) A lassú inward áramok (SIC) kialakulásához szükség van az asztrociták által felszabadított glutamatra (1) és a neuronok GluN2B alegységet tartalmazó NMDA receptorok aktivációjára (2). A SIC-ek megfigyelhetők mind egerekben (balra), mind emberekben (jobbra), de kinetikájukban különböznek (3). (b) Fiatal és felnőtt egerekben (balra) a szinaptikus depresszió vagy facilitáció időzítésfüggően jön létre. A szinaptikus plaszticitás milyensége attól függ, hogy az asztrociták a szinapszistól milyen messze szabadították fel a glutamátot. Emberekben csak facilitációt figyelhettünk meg, ami valószínűleg az asztrociták morfológiájának és azok összetettségének következménye. (c) Az öregedéssel a SIC-ek szinaptikus plaszticitása csökken. Egerekben a szinaptikus válaszkészség változik az életkorral (balra), míg emberekben maga a SIC esik áldozatul az öregedés folyamatának (jobbra).

A SIC-ek és különböző patológiai kórképek

A SIC-ek fiziológiai körülmények között is megjelennek, viszont igen kicsi, 0,1 Hz (vagy az alatti) frekvenciával. Ez az alacsony frekvencia felveti a kérdést, hogy vajon a SIC-ek szinaptikus erősséget szabályozó képessége valóban olyan jelentős-e, mint ahogy gondoljuk,

de mint homeosztatisz szabályozó különbözőképpen befolyásolhatja a szinapszisokat egy asztrocita doménen belül. A SIC-ek stimuláló funkciót tölthetnek be azon neuronok esetében, amik az asztrociták glutamát felszabadításához közel helyezkednek el, míg attól távolabb lévő neuronokban szuppresszió alakulhat ki. Ha a SIC-eket fiziológias eseményeknek tekintjük, amik befolyásolják a szinaptikus plaszticitást, akkor az időskori kognitív képességek romlásához hozzájárulhat a SIC-aktivitás csökkenése.

Amennyiben a SIC-ekre patológias eseményként tekintünk, az eredeti elgondoláshoz képest nagyobb hatással lehetnek a szinaptikus plaszticitásra. Patológias körülmények között (pl. epilepszia modell nominálisan magnéziummentes oldattal) nagyobb SIC-frekvenciát mérhettünk, mint fiziológias körülmények között. A random előforduló nagy események véletlenszerűen időzítve a szinaptikus aktivitás növekedését okozhatják, vagy megváltoztathatják a szinaptikus erősséget, ami jelentősen hozzájárulhat a terjedő depolarizációhoz, vagy akár az excitotoxicitáshoz. Patológias körülmények között akár előnyös is lehet a SIC-ek aktivitásának csökkenése, mivel ez összefüggésben lehet azzal, hogy az életkorral csökken a kéreg depolarizációval szembeni sebezhetősége (300).

Az astaxanthin hatása a hypothalamus neuronjaira

A hypothalamus részeként a nucleus arcuatus fontos szerepet játszik a táplálékfelvételben. Az itt megtalálható két fő neuroncsoport ellentétesen szabályozzák az étvágyat és a táplálék felvételét: Az anorexigén típusú POMC sejtek csökkentik, míg az orexigén csoportúhoz tartozó NPY és az AgRP- pozitív sejtek fokozzák a táplálék-felvételt (301–303). A POMC sejtek stimulációja a testsúly csökkenését eredményezi (304), míg a sejtek csökkent aktivitása elhízást okozhat (301,305).

A szervezet aktuális energetikai állapotától függően a GABAerg bemenetek képesek befolyásolni a POMC sejtek működését (306). A GABAerg gátló bemenetek a hypothalamus dorsomedialis részéről érkeznek és az orexigén AgRP sejtekből (301,305,307,308). A POMC neuronokat beidegző rostokon a spontán IPSC-k gyakorisága kalóriadeficit során megnő (301).

A glükóz és zsírsav közvetlenül hat a nucleus arcuatus sejtjeire, és azok aktivitásának szabályozásában részt vesznek, emellett vannak olyan olajsavakat érzékelő neuronok, amik a glükózzal is képesek kölcsönhatásba lépni. Az extracelluláris glükóz szint változásai képesek bizonyos neuroncsoportokat stimulálni és gátolni. A glükózra érzékeny neuronok az ATP-szenzitív kálium-csatornákkal (KATP-csatornák) képesek a vér glükóz szintjét

megállapítani. Azok a neuronok, amiknek a működését a glükóz serkenti, a glükózsztint emelkedésével a KATP-csatornán keresztüli áram csökkent és az akciós potenciálok frekvenciája nőtt. A glükóz által gátolt neuronokban a glükóz hatására klorid-csatornák nyílnak meg (309–312).

Mendoza és munkatársai a krill olaj hatását vizsgálták mozdulatlanági stressz modellt használva, ami a hosszútávú, krónikus stresszt hivatott modellezni. A stressz modell depresszió-szerű viselkedést, memóriazavart és szorongást okozott az egereknél, amit magas ASX koncentrációjú krill olajjal próbáltak ellensúlyozni. Az ASX csökkentette a stressz okozta asztrocita-szám csökkenést, a depressziós viselkedést és az oxidatív stresszt, illetve a kognitív károsodásra is jótékony hatással volt (313).

Míg az olajsavak tónusos áramot váltottak ki, addig a várakozásainkkal ellentétben az ASX ilyen módon nem hatott az ingerlékenységre. Azonban - hasonlóan az éhezéssel állapothoz – a POMC neuronokban megnőtt a spontán IPSC-k frekvenciája. Valószínűleg ez a frekvencia-növekedés a GABAerg neuronokon kifejtett pleiotróp hatásoknak köszönhető, mivel a spontán tüzelési frekvencia is megnőtt. Ez részben az excitatórikus bemenetek erősödése miatt történhetett. A GABAerg aktivitás inhibitórikus növekedése elősegíthette az astaxanthin tartalmú étel fokozott fogyasztását egerekben, mivel a POMC neuronok gátlása növeli a táplálék felvételt (314). Habár az általunk preparált koronális szeletek tartalmazzák a nucleus arcuatust és a dorsomediális hypothalamust, ami a GABAerg bemenetek fő forrásai, és gátló szinapszisokkal befolyásolják a POMC neuronokat, sajnos az agyszeletek preparálása során elveszhetnek bizonyos szinaptikus kapcsolatok, ezáltal alábecsülhettük a gátló bemenetek IPSC-kre gyakorolt hatását.

Összefoglalás

Ezen értekezés során szerettük volna megvizsgálni a SIC-ek eredetét, illetve paramétereiben található különbségeket egér és humán corticalis mintákban. A SIC-ek humán és egér mintákban is elkülöníthetők az EPSC-ktől, a SIC-ek amplitúdója, rise time-ja, decay time-ja és töltésáramlása is szignifikánsan nagyobb volt, mint az EPSC-k ugyanezen paramétereit, mindkét faj esetében. Az irodalmi adatoknak megfelelően a GluN2B alegységet tartalmazó extraszinaptikus NMDA receptorok szükségesek a SIC-ek kialakulásához. Az asztrociták aktivitásának és glutamát-felszabadításának szerepét a SIC-ek kialakulásában kemogenetikai aktuátor segítségével vizsgáltuk egerekben. A hM3D aktuátor segítségével és annak asztrocita-specifikus aktivációjával a SIC-ek aktivitása szignifikáns növekedést mutatott a kontrollhoz képest. A humán minták esetében (kemogenetikai vizsgálatok lehetőségének hiányában) a glutamát felszabadulás modellezésére WAY213613-at alkalmaztunk az EAAT2 glutamát transzporter gátlásához. A kontrollhoz képest a WAY szignifikánsan megemelte a SIC-ek aktivitását. A két faj között csak a töltésáramlásban találtunk szignifikáns különbséget, a humán minták javára. A SIC-ek szinaptikus plaszticitás befolyásolását vizsgáló kísérleteinkben azt találtuk, hogy a SIC-eket a kiváltott EPSC-khez képest időzítve, azon belül az asztrocitákat kemogenetikailag aktiválva, a glutamátot flash fotolízissel felszabadítva és a SIC-et, mint feszültségparancsot használva, a SIC-ek időzítésfüggően képesek voltak a szinaptikus plaszticitást hosszútávon befolyásolni. A SIC-ek és az öregedés összefüggését vizsgálva azt találtuk, hogy az egér és humán minták között nagyobb különbségek vannak. Míg az egereknél a SIC-ek töltésáramlása az életkorral nem változik, addig az aktivitásuk szignifikánsan csökkent. Ezzel szemben humán mintáknál a SIC aktivitás mellett a töltésáramlás is csökkent, sőt 70 éves kor felett teljesen eltűnt. Ezek mellett az életkor befolyásolta a SIC-ek szinaptikus plaszticitásra gyakorolt hatásának erősségét.

Az astaxanthin hosszútávú etetése egerekben megnövelte a hypothalamus nucleus arcuatus neuronjainak az excitabilitását, valamint az IPSC-k frekvenciáját. A nucleus arcuatus POMC-neuronjain akutan alkalmazott astaxanthin nem szignifikánsan változtatta meg az IPSC frekvenciát. Az astaxanthin a nucleus arcuatus GABAerg neuronjaiban szignifikánsan megnövelte a kalcium tranziens frekvenciáját és tüzelési frekvenciát.

Summary

In this work we aimed to investigate the origin of SICs and the differences in their parameters in mouse and human cortical samples. SICs were distinct from EPSCs, and the amplitude, rise time, decay time and charge transfer of SICs were significantly greater than the same parameters of EPSCs, in both species. According to the literature, GluN2B-containing extrasynaptic NMDA receptors are required for the generation of SICs. We also investigated the role of astrocytic activation and glutamate release in the development of SICs using a chemogenetic actuator in mice. Using the hM3D actuator and its astrocyte-specific activation, SIC-activity showed a significant increase compared to the control. In human samples (in the absence of the possibility to perform chemogenetic experiments), WAY213613 was used to inhibit the astrocyte specific EAAT2 glutamate transporter. WAY significantly increased the activity of SICs. The only significant difference between the two species was found in charge transfer, as it was greater in human. We also investigated the influence of SICs on synaptic plasticity, and found that by chemogenetic activation of astrocytes, releasing glutamate by flash photolysis or using SICs as a voltage command, SICs were able to influence long term synaptic plasticity in a timing-dependent way. Examining the relationship between SICs and aging, we found that there were greater differences between mice and human samples. In mice, the charge transfer of SICs did not change with age, their activity is significantly reduced. In contrast, in humans, SIC activity and charge transfer were decreased, and SICs completely disappeared after the age of 70. In addition, the impact of SICs on synaptic plasticity was declined by age in both species.

Long-term feeding of astaxanthin in mice increased the excitability of the hypothalamic arcuate nucleus neurons and the frequency of IPSCs. Acute astaxanthin application on POMC-positive neurons led to a non-significant increase in IPSC frequency. Astaxanthin, however, significantly increased calcium transient frequency and firing rate in GABAergic neurons of arcuate nucleus.

Irodalomjegyzék

1. Ramón y Cajal. Textura del sistema nervioso del hombre y de los. Madrid: Tomo I, N, Moya,; 1899.
2. Halassa MM, Fellin T, Takano H, Dong JH, Haydon PG. Synaptic Islands Defined by the Territory of a Single Astrocyte. *Journal of Neuroscience*. 2007. június 13.;27(24):6473–7.
3. Robertson JM. Astrocyte domains and the three-dimensional and seamless expression of consciousness and explicit memories. *Med Hypotheses*. 2013. december;81(6):1017–24.
4. Oberheim NA, Takano T, Han X, He W, Lin JHC, Wang F, és mtsai. Uniquely Hominid Features of Adult Human Astrocytes. *The Journal of Neuroscience*. 2009. március 11.;29(10):3276–87.
5. Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA. Control of Synapse Number by Glia. *Science* (1979). 2001. január 26.;291(5504):657–61.
6. Giaume C, McCarthy KD. Control of gap-junctional communication in astrocytic networks. *Trends Neurosci*. 1996. augusztus;19(8):319–25.
7. Orr AG, Hsiao EC, Wang MM, Ho K, Kim DH, Wang X, és mtsai. Astrocytic adenosine receptor A2A and Gs-coupled signaling regulate memory. *Nat Neurosci*. 2015. március 26.;18(3):423–34.
8. Schousboe A. Role of Astrocytes in the Maintenance and Modulation of Glutamatergic and GABAergic Neurotransmission. *Neurochem Res*. 2003. február;28(2):347–52.
9. Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, és mtsai. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci*. 2003. január 25.;6(1):43–50.
10. Verkhratsky A, Steinhäuser C. Ion channels in glial cells. *Brain Res Rev*. 2000. április;32(2–3):380–412.
11. Charles AC, Merrill JE, Dirksen ER, Sandersont MJ. Intercellular signaling in glial cells: Calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron*. 1991. június;6(6):983–92.
12. Bazargani N, Attwell D. Astrocyte calcium signaling: the third wave. *Nat Neurosci*. 2016. február 27.;19(2):182–9.
13. Perea G, Araque A. Glial calcium signaling and neuron–glia communication. *Cell Calcium*. 2005. szeptember;38(3–4):375–82.
14. Navarrete M, Perea G, Maglio L, Pastor J, Garcia de Sola R, Araque A. Astrocyte Calcium Signal and Gliotransmission in Human Brain Tissue. *Cerebral Cortex*. 2013. május 1.;23(5):1240–6.

15. Araque A, Martín ED, Perea G, Arellano JI, Buño W. Synaptically Released Acetylcholine Evokes Ca²⁺ Elevations in Astrocytes in Hippocampal Slices. *The Journal of Neuroscience*. 2002. április 1.;22(7):2443–50.
16. Verkhratsky A, Orkand RK, Kettenmann H. Glial Calcium: Homeostasis and Signaling Function. *Physiol Rev*. 1998. január 1.;78(1):99–141.
17. Fellin T, Carmignoto G. Neurone-to-astrocyte signalling in the brain represents a distinct multifunctional unit. *J Physiol*. 2004. augusztus;559(1):3–15.
18. Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL, Seifert G, Steinhäuser C, Pilati E, és mtsai. Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci*. 2004. június 23.;7(6):613–20.
19. Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jęftinija K, Jęftinija S, Haydon PG. Glutamate-mediated astrocyte–neuron signalling. *Nature*. 1994. június;369(6483):744–7.
20. Coco S, Calegari F, Pravettoni E, Pozzi D, Taverna E, Rosa P, és mtsai. Storage and Release of ATP from Astrocytes in Culture. *Journal of Biological Chemistry*. 2003. január;278(2):1354–62.
21. Mothet JP, Parent AT, Wolosker H, Brady RO, Linden DJ, Ferris CD, és mtsai. D-Serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-d aspartate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000. április 25.;97(9):4926–31.
22. Stellwagen D, Malenka RC. Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature*. 2006. április 20.;440(7087):1054–9.
23. Ventura R, Harris KM. Three-Dimensional Relationships between Hippocampal Synapses and Astrocytes. *The Journal of Neuroscience*. 1999. augusztus 15.;19(16):6897–906.
24. Grosche J, Kettenmann H, Reichenbach A. Bergmann glial cells form distinct morphological structures to interact with cerebellar neurons. *J Neurosci Res*. 2002. április 15.;68(2):138–49.
25. Murphy T, Blatter L, Wier W, Baraban J. Rapid communication between neurons and astrocytes in primary cortical cultures. *The Journal of Neuroscience*. 1993. június 1.;13(6):2672–9.
26. Mennerick S, Zorumski CF. Glial contributions to excitatory neurotransmission in cultured hippocampal cells. *Nature*. 1994. március;368(6466):59–62.
27. Seifert G, Steinhäuser C. Ionotropic glutamate receptors in astrocytes. In 2001. o. 287–99.
28. Cai Z, Schools GP, Kimelberg HK. Metabotropic glutamate receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes: Developmental changes of mGluR5 mRNA and functional expression. *Glia*. 2000. január 1.;29(1):70–80.

29. Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ. Glutamate Induces Calcium Waves in Cultured Astrocytes: Long-Range Glial Signaling. *Science* (1979). 1990. január 26.;247(4941):470–3.
30. Schipke CG, Boucsein C, Ohlemeyer C, Kirchhoff F, Kettenmann H. Astrocyte Ca²⁺ waves trigger responses in microglial cells in brain slices. *The FASEB Journal*. 2002. február 28.;16(2):1–16.
31. Hirase H, Qian L, Barthó P, Buzsáki G. Calcium Dynamics of Cortical Astrocytic Networks In Vivo. *PLoS Biol*. 2004. április 13.;2(4):e96.
32. Dombeck DA, Khabbaz AN, Collman F, Adelman TL, Tank DW. Imaging Large-Scale Neural Activity with Cellular Resolution in Awake, Mobile Mice. *Neuron*. 2007. október;56(1):43–57.
33. Winship IR, Plaa N, Murphy TH. Rapid Astrocyte Calcium Signals Correlate with Neuronal Activity and Onset of the Hemodynamic Response In Vivo. *Journal of Neuroscience*. 2007. június 6.;27(23):6268–72.
34. Wang X, Lou N, Xu Q, Tian GF, Peng WG, Han X, és mtsai. Astrocytic Ca²⁺ signaling evoked by sensory stimulation in vivo. *Nat Neurosci*. 2006. június 14.;9(6):816–23.
35. Takata N, Hirase H. Cortical Layer 1 and Layer 2/3 Astrocytes Exhibit Distinct Calcium Dynamics In Vivo. *PLoS One*. 2008. június 25.;3(6):e2525.
36. Fatatis A, Russell JT. Spontaneous changes in intracellular calcium concentration in type I astrocytes from rat cerebral cortex in primary culture. *Glia*. 1992;5(2):95–104.
37. Nett WJ, Oloff SH, McCarthy KD. Hippocampal Astrocytes In Situ Exhibit Calcium Oscillations That Occur Independent of Neuronal Activity. *J Neurophysiol*. 2002. január 1.;87(1):528–37.
38. Schummers J, Yu H, Sur M. Tuned Responses of Astrocytes and Their Influence on Hemodynamic Signals in the Visual Cortex. *Science* (1979). 2008. június 20.;320(5883):1638–43.
39. Bergles DE, Dzubay JA, Jahr CE. Glutamate transporter currents in Bergmann glial cells follow the time course of extrasynaptic glutamate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997. december 23.;94(26):14821–5.
40. Perea G, Araque A. Synaptic regulation of the astrocyte calcium signal. *J Neural Transm*. 2005. január 18.;112(1):127–35.
41. Eroglu C, Barres BA. Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature*. 2010. november 10.;468(7321):223–31.
42. Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*. 2001. szeptember;65(1):1–105.
43. Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kunel RW, és mtsai. Knockout of Glutamate Transporters Reveals a Major Role for Astroglial Transport in Excitotoxicity and Clearance of Glutamate. *Neuron*. 1996. március;16(3):675–86.

44. Arnth-Jensen N, Jabaudon D, Scanziani M. Cooperation between independent hippocampal synapses is controlled by glutamate uptake. *Nat Neurosci*. 2002. április 1.;5(4):325–31.
45. Huang YH, Sinha SR, Tanaka K, Rothstein JD, Bergles DE. Astrocyte Glutamate Transporters Regulate Metabotropic Glutamate Receptor-Mediated Excitation of Hippocampal Interneurons. *The Journal of Neuroscience*. 2004. május 12.;24(19):4551–9.
46. Paixão S, Klein R. Neuron–astrocyte communication and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol*. 2010. augusztus;20(4):466–73.
47. Alleva C, Machtens JP, Kortzak D, Weyand I, Fahlke C. Molecular Basis of Coupled Transport and Anion Conduction in Excitatory Amino Acid Transporters. *Neurochem Res*. 2022. január 15.;47(1):9–22.
48. Milton M, Smith PD. It's All about Timing: The Involvement of Kir4.1 Channel Regulation in Acute Ischemic Stroke Pathology. *Front Cell Neurosci*. 2018. február 16.;12.
49. Rose CF, Verkhratsky A, Parpura V. Astrocyte glutamine synthetase: pivotal in health and disease. *Biochem Soc Trans*. 2013. december 1.;41(6):1518–24.
50. Hertz L, Dringen R, Schousboe A, Robinson SR. Astrocytes: Glutamate producers for neurons. *J Neurosci Res*. 1999. augusztus 15.;57(4):417–28.
51. Fellin T, Pascual O, Gobbo S, Pozzan T, Haydon PG, Carmignoto G. Neuronal Synchrony Mediated by Astrocytic Glutamate through Activation of Extrasynaptic NMDA Receptors. *Neuron*. 2004. szeptember;43(5):729–43.
52. Pasti L, Zonta M, Pozzan T, Vicini S, Carmignoto G. Cytosolic Calcium Oscillations in Astrocytes May Regulate Exocytotic Release of Glutamate. *The Journal of Neuroscience*. 2001. január 15.;21(2):477–84.
53. Longuemare MC, Swanson RA. Excitatory amino acid release from astrocytes during energy failure by reversal of sodium-dependent uptake. *J Neurosci Res*. 1995. február 15.;40(3):379–86.
54. Szatkowski M, Barbour B, Attwell D. Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature*. 1990. november;348(6300):443–6.
55. Kimelberg HK, Rutledge E, Goderie S, Charniga C. Astrocytic Swelling Due to Hypotonic or High K⁺ Medium Causes Inhibition of Glutamate and Aspartate Uptake and Increases Their Release. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 1995. május 29.;15(3):409–16.
56. Nedergaard M, Takano T, Hansen AJ. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci*. 2002. szeptember 1.;3(9):748–55.
57. Duan S, Anderson CM, Keung EC, Chen Y, Chen Y, Swanson RA. P2X7 Receptor-Mediated Release of Excitatory Amino Acids from Astrocytes. *The Journal of Neuroscience*. 2003. február 15.;23(4):1320–8.

58. Ye ZC, Wyeth MS, Baltan-Tekkok S, Ransom BR. Functional Hemichannels in Astrocytes: A Novel Mechanism of Glutamate Release. *The Journal of Neuroscience*. 2003. május 1.;23(9):3588–96.
59. Baker DA, Xi ZX, Shen H, Swanson CJ, Kalivas PW. The Origin and Neuronal Function of *In Vivo* Nonsynaptic Glutamate. *The Journal of Neuroscience*. 2002. október 15.;22(20):9134–41.
60. Warr O, Takahashi M, Attwell D. Modulation of extracellular glutamate concentration in rat brain slices by cystine-glutamate exchange. *J Physiol*. 1999. február 8.;514(3):783–93.
61. Nedergaard M, Takano T, Hansen AJ. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci*. 2002. szeptember 1.;3(9):748–55.
62. Zhang Q, Pangršič T, Kreft M, Kržan M, Li N, Sul JY, és mtsai. Fusion-related Release of Glutamate from Astrocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 2004. március;279(13):12724–33.
63. Montana V, Ni Y, Sunjara V, Hua X, Parpura V. Vesicular Glutamate Transporter-Dependent Glutamate Release from Astrocytes. *The Journal of Neuroscience*. 2004. március 17.;24(11):2633–42.
64. Araque A, Li N, Doyle RT, Haydon PG. SNARE Protein-Dependent Glutamate Release from Astrocytes. *The Journal of Neuroscience*. 2000. január 15.;20(2):666–73.
65. Parpura V, Fang Y, Basarsky T, Jahn R, Haydon P G. Expression of synaptobrevin II, cellubrevin and syntaxin but not SNAP-25 in cultured astrocytes. *FEBS Lett*. 1995. december 27.;377(3):489–92.
66. Maienschein V, Marxen M, Volkandt W, Zimmermann H. A plethora of presynaptic proteins associated with ATP-storing organelles in cultured astrocytes. *Glia*. 1999. május;26(3):233–44.
67. Zhang Q, Fukuda M, Van Bockstaele E, Pascual O, Haydon PG. Synaptotagmin IV regulates glial glutamate release. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004. június 22.;101(25):9441–6.
68. Crippa D, Schenk U, Francolini M, Rosa P, Verderio C, Zonta M, és mtsai. Synaptobrevin2-expressing vesicles in rat astrocytes: insights into molecular characterization, dynamics and exocytosis. *J Physiol*. 2006. február;570(3):567–82.
69. van der Zeyden M, Oldenziel WH, Rea K, Cremers TI, Westerink BH. Microdialysis of GABA and glutamate: Analysis, interpretation and comparison with microsensors. *Pharmacol Biochem Behav*. 2008. augusztus;90(2):135–47.
70. Moussawi K, Riegel A, Nair S, Kalivas PW. Extracellular Glutamate: Functional Compartments Operate in Different Concentration Ranges. *Front Syst Neurosci*. 2011;5.
71. Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol*. 2001. június;11(3):327–35.

72. Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*. 1984. február;307(5950):462–5.
73. Marwick KFM, Hansen KB, Skehel PA, Hardingham GE, Wyllie DJA. Functional assessment of triheteromeric NMDA receptors containing a human variant associated with epilepsy. *J Physiol*. 2019. március 30.;597(6):1691–704.
74. Luscher C, Malenka RC. NMDA Receptor-Dependent Long-Term Potentiation and Long-Term Depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012. június 1.;4(6):a005710–a005710.
75. Schell MJ, Molliver ME, Snyder SH. D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995. április 25.;92(9):3948–52.
76. Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennett MVL, Charles AC, Kater SB. ATP Released from Astrocytes Mediates Glial Calcium Waves. *The Journal of Neuroscience*. 1999. január 15.;19(2):520–8.
77. Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*. 1994. március;12(3):529–40.
78. Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci*. 2013. június 20.;14(6):383–400.
79. Tovar KR, Westbrook GL. The Incorporation of NMDA Receptors with a Distinct Subunit Composition at Nascent Hippocampal Synapses *In Vitro*. *The Journal of Neuroscience*. 1999. május 15.;19(10):4180–8.
80. Petralia RS. Distribution of Extrasynaptic NMDA Receptors on Neurons. *The Scientific World Journal*. 2012;2012:1–11.
81. Lau CG, Zukin RS. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2007. június;8(6):413–26.
82. Papouin T, Oliet SHR. Organization, control and function of extrasynaptic NMDA receptors. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2014. október 19.;369(1654):20130601.
83. Dore K, Stein IS, Brock JA, Castillo PE, Zito K, Sjöström PJ. Unconventional NMDA Receptor Signaling. *The Journal of Neuroscience*. 2017. november 8.;37(45):10800–7.
84. Singh P, Doshi S, Spaethling JM, Hockenberry AJ, Patel TP, Geddes-Klein DM, és mtsai. N-Methyl-d-aspartate Receptor Mechanosensitivity Is Governed by C Terminus of NR2B Subunit. *Journal of Biological Chemistry*. 2012. február;287(6):4348–59.

85. Sans NA, Montcouquiol ME, Raymond J. Postnatal developmental changes in AMPA and NMDA receptors in the rat vestibular nuclei. *Developmental Brain Research*. 2000. szeptember;123(1):41–52.
86. Bellone C, Nicoll RA. Rapid Bidirectional Switching of Synaptic NMDA Receptors. *Neuron*. 2007. szeptember;55(5):779–85.
87. Cho KKA, Khibnik L, Philpot BD, Bear MF. The ratio of NR2A/B NMDA receptor subunits determines the qualities of ocular dominance plasticity in visual cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009. március 31.;106(13):5377–82.
88. Matta JA, Ashby MC, Sanz-Clemente A, Roche KW, Isaac JTR. mGluR5 and NMDA Receptors Drive the Experience- and Activity-Dependent NMDA Receptor NR2B to NR2A Subunit Switch. *Neuron*. 2011. április;70(2):339–51.
89. Conti F, Weinberg RJ. Shaping excitation at glutamatergic synapses. *Trends Neurosci*. 1999. október;22(10):451–8.
90. Haydon PG. Glia: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci*. 2001. március 1.;2(3):185–93.
91. Ferraguti F, Shigemoto R. Metabotropic glutamate receptors. *Cell Tissue Res*. 2006. november 18.;326(2):483–504.
92. Furuichi T, Simon-Chazottes D, Fujino I, Yamada N, Hasegawa M, Miyawaki A, és mtsai. Widespread expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 gene (*Insp3r1*) in the mouse central nervous system. *Recept Channels*. 1993;1(1):11–24.
93. Iglesias I, Castillo CA, León D, Ruíz MÁ, Albasanz JL, Martín M. Metabotropic glutamate receptor/phospholipase C system in female rat heart. *Brain Res*. 2007. június;1153:1–11.
94. Luján R, Roberts JDB, Shigemoto R, Ohishi H, Somogyi P. Differential plasma membrane distribution of metabotropic glutamate receptors mGluR1 α , mGluR2 and mGluR5, relative to neurotransmitter release sites. *J Chem Neuroanat*. 1997. október;13(4):219–41.
95. Tamaru Y, Nomura S, Mizuno N, Shigemoto R. Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR3 in the mouse CNS: differential location relative to pre- and postsynaptic sites. *Neuroscience*. 2001. szeptember;106(3):481–503.
96. Gerber U, Gee C, Benquet P. Metabotropic glutamate receptors: intracellular signaling pathways. *Curr Opin Pharmacol*. 2007. február;7(1):56–61.
97. Kirschstein T, von der Brellie C, Steinhäuser M, Vinçon A, Beck H, Dietrich D. L-CCG-I activates group III metabotropic glutamate receptors in the hippocampal CA3 region. *Neuropharmacology*. 2004. augusztus;47(2):157–62.
98. Zhou JJ, Pachuau J, Li DP, Chen SR, Pan HL. Group III metabotropic glutamate receptors regulate hypothalamic presympathetic neurons through opposing presynaptic and postsynaptic actions in hypertension. *Neuropharmacology*. 2020. szeptember;174:108159.

99. Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience*. 1998. június;10(6):2129–42.
100. Perea G, Araque A. Astrocytes Potentiate Transmitter Release at Single Hippocampal Synapses. *Science* (1979). 2007. augusztus 24.;317(5841):1083–6.
101. Fiacco TA, McCarthy KD. Intracellular Astrocyte Calcium Waves In Situ Increase the Frequency of Spontaneous AMPA Receptor Currents in CA1 Pyramidal Neurons. *The Journal of Neuroscience*. 2004. január 21.;24(3):722–32.
102. Bonansco C, Couve A, Perea G, Ferradas CÁ, Roncagliolo M, Fuenzalida M. Glutamate released spontaneously from astrocytes sets the threshold for synaptic plasticity. *European Journal of Neuroscience*. 2011. április;33(8):1483–92.
103. Hebb D. *The Organization of Behavior*. New York: Wiley; 1949.
104. De Pittà M, Brunel N, Volterra A. Astrocytes: Orchestrating synaptic plasticity? *Neuroscience*. 2016. május;323:43–61.
105. Perea G, Yang A, Boyden ES, Sur M. Optogenetic astrocyte activation modulates response selectivity of visual cortex neurons in vivo. *Nat Commun*. 2014. február 6.;5(1):3262.
106. Abbott LF, Regehr WG. Synaptic computation. *Nature*. 2004. október 13.;431(7010):796–803.
107. Abraham WC. How long will long-term potentiation last? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2003. április 29.;358(1432):735–44.
108. Turrigiano G. Too Many Cooks? Intrinsic and Synaptic Homeostatic Mechanisms in Cortical Circuit Refinement. *Annu Rev Neurosci*. 2011. július 21.;34(1):89–103.
109. Vitureira N, Letellier M, Goda Y. Homeostatic synaptic plasticity: from single synapses to neural circuits. *Curr Opin Neurobiol*. 2012. június;22(3):516–21.
110. Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*. 2004. szeptember;44(1):5–21.
111. Jenks KR, Tsimring K, Ip JPK, Zepeda JC, Sur M. Heterosynaptic Plasticity and the Experience-Dependent Refinement of Developing Neuronal Circuits. *Front Neural Circuits*. 2021. december 7.;15.
112. Bliss TVP, Gardner-Medwin AR. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*. 1973. július 1.;232(2):357–74.
113. Zakharenko SS, Zablow L, Siegelbaum SA. Visualization of changes in presynaptic function during long-term synaptic plasticity. *Nat Neurosci*. 2001. július;4(7):711–7.
114. Larson J, Wong D, Lynch G. Patterned stimulation at the theta frequency is optimal for the induction of hippocampal long-term potentiation. *Brain Res*. 1986. március;368(2):347–50.

115. Valdés-Undurraga I, Lobos P, Sánchez-Robledo V, Arias-Cavieres A, SanMartín CD, Barrientos G, és mtsai. Long-term potentiation and spatial memory training stimulate the hippocampal expression of RyR2 calcium release channels. *Front Cell Neurosci.* 2023. március 21.;17.
116. Fujii S, Mikoshiba K, Kuroda Y, Ahmed TM, Kato H. Cooperativity between activation of metabotropic glutamate receptors and NMDA receptors in the induction of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Neurosci Res.* 2003. augusztus;46(4):509–21.
117. Navarrete M, Perea G, de Sevilla DF, Gómez-Gonzalo M, Núñez A, Martín ED, és mtsai. Astrocytes Mediate In Vivo Cholinergic-Induced Synaptic Plasticity. *PLoS Biol.* 2012. február 14.;10(2):e1001259.
118. Min R, Nevian T. Astrocyte signaling controls spike timing–dependent depression at neocortical synapses. *Nat Neurosci.* 2012. május 25.;15(5):746–53.
119. Man KNM, Bartels P, Henderson PB, Kim K, Shi M, Zhang M, és mtsai. α 1-Adrenergic receptor–PKC–Pyk2–Src signaling boosts L-type Ca^{2+} channel $\text{CaV}1.2$ activity and long-term potentiation in rodents. *Elife.* 2023. június 20.;12.
120. Lisman J, Schulman H, Cline H. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci.* 2002. március 1.;3(3):175–90.
121. Stein IS, Park DK, Claiborne N, Zito K. Non-ionotropic NMDA receptor signaling gates bidirectional structural plasticity of dendritic spines. *Cell Rep.* 2021. január;34(4):108664.
122. Sweatt JD. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol.* 2004. június;14(3):311–7.
123. Derkach V, Barria A, Soderling TR. Ca^{2+} /calmodulin-kinase II enhances channel conductance of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1999. március 16.;96(6):3269–74.
124. Benke TA, Lüthi A, Isaac JTR, Collingridge GL. Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature.* 1998. június;393(6687):793–7.
125. Miyamoto E. Molecular Mechanism of Neuronal Plasticity: Induction and Maintenance of Long-Term Potentiation in the Hippocampus. *J Pharmacol Sci.* 2006;100(5):433–42.
126. Kennedy MJ, Ehlers MD. Mechanisms and Function of Dendritic Exocytosis. *Neuron.* 2011. március;69(5):856–75.
127. Taniike N, Lu YF, Tomizawa K, Matsui H. Critical differences in magnitude and duration of N-methyl D-aspartate(NMDA) receptor activation between long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) induction. *Acta Med Okayama.* 2008. február;62(1):21–8.
128. Volianskis A, Bannister N, Collett VJ, Irvine MW, Monaghan DT, Fitzjohn SM, és mtsai. Different NMDA receptor subtypes mediate induction of long-term

- potentiation and two forms of short-term potentiation at CA1 synapses in rat hippocampus in vitro. *J Physiol*. 2013. február;591(4):955–72.
129. Zeeman M, Liu X, Zhang O, Yan J. Role of N-methyl-d-aspartate receptor subunits GluN2A and GluN2B in auditory thalamocortical long-term potentiation in adult mice. *Neurosci Lett*. 2021. szeptember;761:136091.
 130. Dalton GL, Wu DC, Wang YT, Floresco SB, Phillips AG. NMDA GluN2A and GluN2B receptors play separate roles in the induction of LTP and LTD in the amygdala and in the acquisition and extinction of conditioned fear. *Neuropharmacology*. 2012. február;62(2):797–806.
 131. Balsara RD, Ferreira AN, Donahue DL, Castellino FJ, Sheets PL. Probing NMDA receptor GluN2A and GluN2B subunit expression and distribution in cortical neurons. *Neuropharmacology*. 2014. április;79:542–9.
 132. Li P, Li YH, Han TZ. NR2A-containing NMDA receptors are required for LTP induction in rat dorsolateral striatum in vitro. *Brain Res*. 2009. június;1274:40–6.
 133. Müller T, Albrecht D, Gebhardt C. Both NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor are critical for long-term potentiation and long-term depression in the lateral amygdala of horizontal slices of adult mice. *Learning & Memory*. 2009. június;16(6):395–405.
 134. Lesuis SL, Lucassen PJ, Krugers HJ. Early life stress impairs fear memory and synaptic plasticity; a potential role for GluN2B. *Neuropharmacology*. 2019. május;149:195–203.
 135. Mikics E, Toth M, Biro L, Bruzsik B, Nagy B, Haller J. The role of GluN2B-containing NMDA receptors in short- and long-term fear recall. *Physiol Behav*. 2017. augusztus;177:44–8.
 136. Rebola N, Lujan R, Cunha RA, Mulle C. Adenosine A2A Receptors Are Essential for Long-Term Potentiation of NMDA-EPSCs at Hippocampal Mossy Fiber Synapses. *Neuron*. 2008. január;57(1):121–34.
 137. Bliss TVP, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 1993. január;361(6407):31–9.
 138. Lynch G, Larson J, Kelso S, Barrionuevo G, Schottler F. Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature*. 1983. október;305(5936):719–21.
 139. Galván EJ, Pérez-Rosello T, Gómez-Lira G, Lara E, Gutiérrez R, Barrionuevo G. Synapse-specific compartmentalization of signaling cascades for LTP induction in CA3 interneurons. *Neuroscience*. 2015. április;290:332–45.
 140. Kirkwood A, Bear MF. Elementary forms of synaptic plasticity in the visual cortex. *Biol Res*. 1995;28(1):73–80.
 141. Ngezahayo A, Schachner M, Artola A. Synaptic Activity Modulates the Induction of Bidirectional Synaptic Changes in Adult Mouse Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*. 2000. április 1.;20(7):2451–8.

142. Watabe AM, Carlisle HJ, O'Dell TJ. Postsynaptic Induction and Presynaptic Expression of Group 1 mGluR-Dependent LTD in the Hippocampal CA1 Region. *J Neurophysiol.* 2002. március 1.;87(3):1395–403.
143. Oliet SHR, Malenka RC, Nicoll RA. Two Distinct Forms of Long-Term Depression Coexist in CA1 Hippocampal Pyramidal Cells. *Neuron.* 1997. június;18(6):969–82.
144. Fujii S, Sasaki H, Mikoshiba K, Kuroda Y, Yamazaki Y, Mostafa Taufiq A, és mtsai. A chemical LTP induced by co-activation of metabotropic and N-methyl-d-aspartate glutamate receptors in hippocampal CA1 neurons. *Brain Res.* 2004. február;999(1):20–8.
145. Li YH, Li Y, Zheng L, Wang J. Postsynaptic GluN2B-containing NMDA receptors contribute to long-term depression induction in medial vestibular nucleus neurons of juvenile rats. *Neurosci Lett.* 2020. január;715:134674.
146. Li YH, Wang J, Zhang G. Involvement of synaptic NR2B-containing NMDA receptors in long-term depression induction in the young rat visual cortex in vitro. *Chin J Physiol.* 2011. június 30.;54(3):190–5.
147. Morishita W, Lu W, Smith GB, Nicoll RA, Bear MF, Malenka RC. Activation of NR2B-containing NMDA receptors is not required for NMDA receptor-dependent long-term depression. *Neuropharmacology.* 2007. január;52(1):71–6.
148. Linden DJ, Dickinson MH, Smeyne M, Connor JA. A long-term depression of AMPA currents in cultured cerebellar purkinje neurons. *Neuron.* 1991. július;7(1):81–9.
149. Lalo U, Pankratov Y. Role for Astrocytes in mGluR-Dependent LTD in the Neocortex and Hippocampus. *Brain Sci.* 2022. december 15.;12(12):1718.
150. van Dam EJM, Ruitter B, Kamal A, Ramakers GMJ, Gispen WH, de Graan PNE. N-methyl-d-aspartate-induced long-term depression is associated with a decrease in postsynaptic protein kinase C substrate phosphorylation in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett.* 2002. március;320(3):129–32.
151. Lee HK, Takamiya K, Kameyama K, He K, Yu S, Rossetti L, és mtsai. Identification and characterization of a novel phosphorylation site on the GluR1 subunit of AMPA receptors. *Molecular and Cellular Neuroscience.* 2007. szeptember;36(1):86–94.
152. Shonesy BC, Jalan-Sakrikar N, Cavener VS, Colbran RJ. CaMKII: a molecular substrate for synaptic plasticity and memory. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2014;122:61–87.
153. Gao J, Hu XD, Yang H, Xia H. Distinct Roles of Protein Phosphatase 1 Bound on Neurabin and Spinophilin and Its Regulation in AMPA Receptor Trafficking and LTD Induction. *Mol Neurobiol.* 2018. szeptember 30.;55(9):7179–86.
154. Santos SD, Carvalho AL, Caldeira MV, Duarte CB. Regulation of AMPA receptors and synaptic plasticity. *Neuroscience.* 2009. január;158(1):105–25.

155. McNaughton BL, Douglas RM, Goddard GV. Synaptic enhancement in fascia dentata: Cooperativity among coactive afferents. *Brain Res.* 1978. november;157(2):277–93.
156. Baranyi A, Fehér O. Intracellular studies on cortical synaptic plasticity. *Exp Brain Res.* 1981. január;41(2).
157. Feldman DE. The Spike-Timing Dependence of Plasticity. *Neuron.* 2012. augusztus;75(4):556–71.
158. Markram H, Lübke J, Frotscher M, Sakmann B. Regulation of Synaptic Efficacy by Coincidence of Postsynaptic APs and EPSPs. *Science (1979).* 1997. január 10.;275(5297):213–5.
159. Dainauskas JJ, Marie H, Migliore M, Saudargiene A. GluN2B-NMDAR subunit contribution on synaptic plasticity: A phenomenological model for CA3-CA1 synapses. *Front Synaptic Neurosci.* 2023. március 15.;15.
160. Rodríguez-Moreno A, Paulsen O. Spike timing–dependent long-term depression requires presynaptic NMDA receptors. *Nat Neurosci.* 2008. július 30.;11(7):744–5.
161. Tazerart S, Mitchell DE, Miranda-Rottmann S, Araya R. A spike-timing-dependent plasticity rule for dendritic spines. *Nat Commun.* 2020. augusztus 26.;11(1):4276.
162. Andrade-Talavera Y, Duque-Feria P, Paulsen O, Rodríguez-Moreno A. Presynaptic Spike Timing-Dependent Long-Term Depression in the Mouse Hippocampus. *Cerebral Cortex.* 2016. augusztus;26(8):3637–54.
163. Yang SN, Tang YG, Zucker RS. Selective Induction of LTP and LTD by Postsynaptic [Ca²⁺]_i Elevation. *J Neurophysiol.* 1999. február 1.;81(2):781–7.
164. Nevian T, Sakmann B. Spine Ca²⁺ Signaling in Spike-Timing-Dependent Plasticity. *The Journal of Neuroscience.* 2006. október 25.;26(43):11001–13.
165. Song S, Miller KD, Abbott LF. Competitive Hebbian learning through spike-timing-dependent synaptic plasticity. *Nat Neurosci.* 2000. szeptember;3(9):919–26.
166. Markram H, Gerstner W, Sjöström PJ. Spike-Timing-Dependent Plasticity: A Comprehensive Overview. *Front Synaptic Neurosci.* 2012;4.
167. Martínez-Gallego I, Rodríguez-Moreno A, Andrade-Talavera Y. Role of Group I Metabotropic Glutamate Receptors in Spike Timing-Dependent Plasticity. *Int J Mol Sci.* 2022. július 15.;23(14):7807.
168. Bender VA, Bender KJ, Brasier DJ, Feldman DE. Two Coincidence Detectors for Spike Timing-Dependent Plasticity in Somatosensory Cortex. *The Journal of Neuroscience.* 2006. április 19.;26(16):4166–77.
169. Banerjee A, Meredith RM, Rodríguez-Moreno A, Mierau SB, Auberson YP, Paulsen O. Double Dissociation of Spike Timing–Dependent Potentiation and Depression by Subunit-Preferring NMDA Receptor Antagonists in Mouse Barrel Cortex. *Cerebral Cortex.* 2009. december;19(12):2959–69.

170. Valtcheva S, Paillé V, Dembitskaya Y, Perez S, Gangarossa G, Fino E, és mtsai. Developmental control of spike-timing-dependent plasticity by tonic GABAergic signaling in striatum. *Neuropharmacology*. 2017. július;121:261–77.
171. Koch G, Ponzio V, Di Lorenzo F, Caltagirone C, Veniero D. Hebbian and Anti-Hebbian Spike-Timing-Dependent Plasticity of Human Cortico-Cortical Connections. *Journal of Neuroscience*. 2013. június 5.;33(23):9725–33.
172. Testa-Silva G. Human synapses show a wide temporal window for spike-timing-dependent plasticity. *Front Synaptic Neurosci*. 2010;
173. Shigetomi E, Bowser DN, Sofroniew M V., Khakh BS. Two Forms of Astrocyte Calcium Excitability Have Distinct Effects on NMDA Receptor-Mediated Slow Inward Currents in Pyramidal Neurons. *Journal of Neuroscience*. 2008. június 25.;28(26):6659–63.
174. Reyes-Haro D, Müller J, Boresch M, Pivneva T, Benedetti B, Scheller A, és mtsai. Neuron–astrocyte interactions in the medial nucleus of the trapezoid body. *Journal of General Physiology*. 2010. június 1.;135(6):583–94.
175. Carmignoto G, Fellin T. Glutamate release from astrocytes as a non-synaptic mechanism for neuronal synchronization in the hippocampus. *Journal of Physiology-Paris*. 2006. március;99(2–3):98–102.
176. D’Ascenzo M, Fellin T, Terunuma M, Revilla-Sanchez R, Meaney DF, Auberson YP, és mtsai. mGluR5 stimulates gliotransmission in the nucleus accumbens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007. február 6.;104(6):1995–2000.
177. Chen N, Sugihara H, Sharma J, Perea G, Petravicz J, Le C, és mtsai. Nucleus basalis-enabled stimulus-specific plasticity in the visual cortex is mediated by astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012. október 9.;109(41).
178. Perea G, Araque A. Properties of Synaptically Evoked Astrocyte Calcium Signal Reveal Synaptic Information Processing by Astrocytes. *The Journal of Neuroscience*. 2005. március 2.;25(9):2192–203.
179. Bardoni R, Ghirri A, Zonta M, Betelli C, Vitale G, Ruggieri V, és mtsai. Glutamate-mediated astrocyte-to-neuron signalling in the rat dorsal horn. *J Physiol*. 2010. március 1.;588(5):831–46.
180. Lauderdale K, Murphy T, Tung T, Davila D, Binder DK, Fiacco TA. Osmotic Edema Rapidly Increases Neuronal Excitability Through Activation of NMDA Receptor-Dependent Slow Inward Currents in Juvenile and Adult Hippocampus. *ASN Neuro*. 2015. október 1.;7(5):175909141560511.
181. Kang N, Xu J, Xu Q, Nedergaard M, Kang J. Astrocytic Glutamate Release-Induced Transient Depolarization and Epileptiform Discharges in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons. *J Neurophysiol*. 2005. december;94(6):4121–30.

182. Angulo MC, Kozlov AS, Charpak S, Audinat E. Glutamate Released from Glial Cells Synchronizes Neuronal Activity in the Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*. 2004. augusztus 4.;24(31):6920–7.
183. Kovács A, Pál B. Astrocyte-Dependent Slow Inward Currents (SICs) Participate in Neuromodulatory Mechanisms in the Pedunculopontine Nucleus (PPN). *Front Cell Neurosci*. 2017. február 1.;11.
184. Kovács A, Baksa B, Bayasgalan T, Szentesi P, Csemer A, Pál B. Orexinergic actions modify occurrence of slow inward currents on neurons in the pedunculopontine nucleus. *Neuroreport*. 2019. október 9.;30(14):933–8.
185. Parri HR, Gould TM, Crunelli V. Spontaneous astrocytic Ca²⁺ oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat Neurosci*. 2001. augusztus;4(8):803–12.
186. Kozlov AS, Angulo MC, Audinat E, Charpak S. Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006. június 27.;103(26):10058–63.
187. Tian GF, Azmi H, Takano T, Xu Q, Peng W, Lin J, és mtsai. An astrocytic basis of epilepsy. *Nat Med*. 2005. szeptember 14.;11(9):973–81.
188. Fellin T, Gomez-Gonzalo M, Gobbo S, Carmignoto G, Haydon PG. Astrocytic Glutamate Is Not Necessary for the Generation of Epileptiform Neuronal Activity in Hippocampal Slices. *The Journal of Neuroscience*. 2006. szeptember 6.;26(36):9312–22.
189. De Pittà M, Brunel N. Modulation of Synaptic Plasticity by Glutamatergic Gliotransmission: A Modeling Study. *Neural Plast*. 2016;2016:1–30.
190. Wade JJ, McDaid LJ, Harkin J, Crunelli V, Kelso JAS. Bidirectional Coupling between Astrocytes and Neurons Mediates Learning and Dynamic Coordination in the Brain: A Multiple Modeling Approach. *PLoS One*. 2011. december 29.;6(12):e29445.
191. Squire L, Berg D, Bloom FE, du Lac S, Ghosh A, Spitzer NC, és mtsai., szerkesztő. *Fundamental Neuroscience*. 3rd kiad. Academic Press; 2008.
192. Cone R, Cowley M, Butler A, Fan W, Marks D, Low M. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes*. 2001. december 8.;25(S5):S63–7.
193. Sternson SM, Eiselt AK. Three Pillars for the Neural Control of Appetite. *Annu Rev Physiol*. 2017. február 10.;79(1):401–23.
194. Candemir B, İleri İ, Yalçın MM, Sel AT, Göker B, Gülbahar Ö, és mtsai. Relationship Between Appetite-Related Peptides and Frailty in Older Adults. *Endocr Res*. 2023. július 3.;48(2–3):35–43.
195. Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS. Interacting Appetite-Regulating Pathways in the Hypothalamic Regulation of Body Weight*. *Endocr Rev*. 1999. február 1.;20(1):68–100.

196. Rui L. Brain regulation of energy balance and body weight. *Rev Endocr Metab Disord.* 2013. december 30.;14(4):387–407.
197. Benite-Ribeiro SA, Putt DA, Soares-Filho MC, Santos JM. The link between hypothalamic epigenetic modifications and long-term feeding control. *Appetite.* 2016. december;107:445–53.
198. Kim SW, Cho KJ, Lee BI. Compensatory actions of orexinergic neurons in the lateral hypothalamus during metabolic or cortical challenges may enable the coupling of metabolic dysfunction and cortical dysfunction. *Med Hypotheses.* 2013. május;80(5):520–6.
199. Morton GJ. Hypothalamic leptin regulation of energy homeostasis and glucose metabolism. *J Physiol.* 2007. szeptember;583(2):437–43.
200. Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjorbaek C, és mtsai. Leptin Differentially Regulates NPY and POMC Neurons Projecting to the Lateral Hypothalamic Area. *Neuron.* 1999. augusztus;23(4):775–86.
201. Belgardt BF, Brüning JC. CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. *Ann N Y Acad Sci.* 2010. november;1212(1):97–113.
202. Lutz TA, Coester B, Whiting L, Dunn-Meynell AA, Boyle CN, Bouret SG, és mtsai. Amylin Selectively Signals Onto POMC Neurons in the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus. *Diabetes.* 2018. május 1.;67(5):805–17.
203. Popovic V, Duntas LH. Brain somatic cross-talk: Ghrelin, leptin and ultimate challengers of obesity. *Nutr Neurosci.* 2005. február 5.;8(1):1–5.
204. Na J, Park BS, Jang D, Kim D, Tu TH, Ryu Y, és mtsai. Distinct Firing Activities of the Hypothalamic Arcuate Nucleus Neurons to Appetite Hormones. *Int J Mol Sci.* 2022. február 26.;23(5):2609.
205. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, és mtsai. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature.* 2001. január;409(6817):194–8.
206. He Y, Cai X, Liu H, Conde KM, Xu P, Li Y, és mtsai. 5-HT recruits distinct neurocircuits to inhibit hunger-driven and non-hunger-driven feeding. *Mol Psychiatry.* 2021. december 21.;26(12):7211–24.
207. Romanova I V., Derkach K V., Mikhrina AL, Sukhov IB, Mikhailova E V., Shpakov AO. The Leptin, Dopamine and Serotonin Receptors in Hypothalamic POMC-Neurons of Normal and Obese Rodents. *Neurochem Res.* 2018. április 3.;43(4):821–37.
208. Heisler LK, Cowley MA, Tecott LH, Fan W, Low MJ, Smart JL, és mtsai. Activation of Central Melanocortin Pathways by Fenfluramine. *Science (1979).* 2002. július 26.;297(5581):609–11.
209. Chen Y, Lin YC, Kuo TW, Knight ZA. Sensory Detection of Food Rapidly Modulates Arcuate Feeding Circuits. *Cell.* 2015. február;160(5):829–41.

210. Schwartz MW, Morton GJ. Keeping hunger at bay. *Nature*. 2002. augusztus;418(6898):595–7.
211. Bian C, Liu C, Zhang G, Tao M, Huang D, Wang C, és mtsai. A chromosome-level genome assembly for the astaxanthin-producing microalga *Haematococcus pluvialis*. *Sci Data*. 2023. augusztus 3.;10(1):511.
212. Tambat VS, Patel AK, Singhania RR, Vadrade AP, Tiwari A, Chen CW, és mtsai. Sustainable mixotrophic microalgae refinery of astaxanthin and lipid from *Chlorella zofingiensis*. *Bioresour Technol*. 2023. november;387:129635.
213. Martínez-Delgado AA, Khandual S, Villanueva-Rodríguez SJ. Chemical stability of astaxanthin integrated into a food matrix: Effects of food processing and methods for preservation. *Food Chem*. 2017. június;225:23–30.
214. Shi H, Deng X, Ji X, Liu N, Cai H. Sources, dynamics in vivo, and application of astaxanthin and lutein in laying hens: A review. *Animal Nutrition*. 2023. június;13:324–33.
215. Cong XY, Miao JK, Zhang HZ, Sun WH, Xing LH, Sun LR, és mtsai. Effects of Drying Methods on the Content, Structural Isomers, and Composition of Astaxanthin in Antarctic Krill. *ACS Omega*. 2019. november 5.;4(19):17972–80.
216. Liu S, Hu W, Fang Y, Cai Y, Zhang J, Liu J, és mtsai. Extraction of oil from wet Antarctic krill (*Euphausia superba*) using a subcritical dimethyl ether method. *RSC Adv*. 2019;9(59):34274–82.
217. Choi S, Koo S. Efficient Syntheses of the Keto-carotenoids Canthaxanthin, Astaxanthin, and Astacene. *J Org Chem*. 2005. április 1.;70(8):3328–31.
218. Nishida Y, Nawaz A, Hecht K, Tobe K. Astaxanthin as a Novel Mitochondrial Regulator: A New Aspect of Carotenoids, beyond Antioxidants. *Nutrients*. 2021. december 27.;14(1):107.
219. Krestinina O, Baburina Y, Krestinin R. Mitochondrion as a Target of Astaxanthin Therapy in Heart Failure. *Int J Mol Sci*. 2021. július 26.;22(15):7964.
220. Naguib YMA. Antioxidant Activities of Astaxanthin and Related Carotenoids. *J Agric Food Chem*. 2000. április 1.;48(4):1150–4.
221. Mori J, Yokoyama H, Sawada T, Miyashita Y, Nagata K. Anti-Oxidative Properties of Astaxanthin and Related Compounds. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*. 2013. január 11.;580(1):52–7.
222. Stachowiak B, Szulc P. Astaxanthin for the Food Industry. *Molecules*. 2021. május 2.;26(9):2666.
223. Visioli F, Artaria C. Astaxanthin in cardiovascular health and disease: mechanisms of action, therapeutic merits, and knowledge gaps. *Food Funct*. 2017;8(1):39–63.
224. D'Aloisio R, Di Antonio L, Toto L, Rispoli M, Di Iorio A, Delvecchio G, és mtsai. Choroidal Changes in Blood Flow in Patients with Intermediate AMD after Oral

- Dietary Supplement Based on Astaxanthin, Bromelain, Vitamin D3, Folic Acid, Lutein, and Antioxidants. *Medicina (B Aires)*. 2022. augusztus 12.;58(8):1092.
225. Wang SL, He LJ, He TB, Han W, Wang Q. [Effect of astaxanthin on oxidative stress of red blood cells and peroxidation damage of membrane]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2015. április;23(2):552–6.
 226. Temel Y, Bengü AŞ, Akkoyun HT, Akkoyun M, Ciftci M. Effect of astaxanthin and aluminum chloride on erythrocyte G6PD and 6PGD enzyme activities *in vivo* and on erythrocyte G6PD *in vitro* in rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2017. október;31(10):e21954.
 227. Radwan B, Prabhakaran A, Rocchetti S, Matuszyk E, Keyes TE, Baranska M. Uptake and anti-inflammatory effects of liposomal astaxanthin on endothelial cells tracked by Raman and fluorescence imaging. *Microchimica Acta*. 2023. augusztus 27.;190(8):332.
 228. Jyonouchi H, Sun S, Gross M. Effect of carotenoids on *in vitro* immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells: Astaxanthin, a carotenoid without vitamin a activity, enhances *in vitro* immunoglobulin production in response to a t-dependent stimulant and antigen. *Nutr Cancer*. 1995. január 1.;23(2):171–83.
 229. Fang J, Bai W, Yang L. Astaxanthin inhibits oxidative stress and apoptosis in diabetic retinopathy. *Acta Histochem*. 2023. augusztus;125(6):152069.
 230. Erzurumlu Y, Catakli D, Dogan HK. Potent carotenoid astaxanthin expands the anti-cancer activity of cisplatin in human prostate cancer cells. *J Nat Med*. 2023. június 2.;77(3):572–83.
 231. Taghiyar S, Pourrajab F, Aarabi MH. Astaxanthin improves fatty acid dysregulation in diabetes by controlling the AMPK-SIRT1 pathway. *EXCLI J*. 2023;22:502–15.
 232. Wika AA, Reason KW, Green JM, Killen LG, McAllister MJ, Waldman HS. Astaxanthin Reduces Heart Rate and Carbohydrate Oxidation Rates During Exercise in Overweight Individuals. *Int J Exerc Sci*. 2023;16(2):252–66.
 233. Sekikawa T, Kizawa Y, Li Y, Miura N. Effects of diet containing astaxanthin on visual function in healthy individuals: a randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel study. *J Clin Biochem Nutr*. 2023;72(1):22–65.
 234. Honda M, Kageyama H, Zhang Y, Hibino T, Goto M. Oral Supplementation with Z-Isomer-Rich Astaxanthin Inhibits Ultraviolet Light-Induced Skin Damage in Guinea Pigs. *Mar Drugs*. 2022. június 24.;20(7):414.
 235. Li S, Gao X, Zhang Q, Zhang X, Lin W, Ding W. Astaxanthin protects spinal cord tissues from apoptosis after spinal cord injury in rats. *Ann Transl Med*. 2021. december;9(24):1796–1796.
 236. Si P, Zhu C. Biological and neurological activities of astaxanthin (Review). *Mol Med Rep*. 2022. augusztus 8.;26(4):300.

237. Yook JS, Okamoto M, Rakwal R, Shibato J, Lee MC, Matsui T, és mtsai. Astaxanthin supplementation enhances adult hippocampal neurogenesis and spatial memory in mice. *Mol Nutr Food Res*. 2016. március;60(3):589–99.
238. Mirsaeed-Ghazi F, Sharifzadeh M, Ashrafi-Kooshk MR, Karima S, Meknatkhah S, Riazi G, és mtsai. Astaxanthin Decreases Spatial Memory and Glutamate Transport Impairment Induced by Fluoride. *Iran J Pharm Res*. 2021;20(4):238–54.
239. Xue Y, Qu Z, Fu J, Zhen J, Wang W, Cai Y, és mtsai. The protective effect of astaxanthin on learning and memory deficits and oxidative stress in a mouse model of repeated cerebral ischemia/reperfusion. *Brain Res Bull*. 2017. május;131:221–8.
240. Kim JH, Nam SW, Kim BW, Choi W, Lee JH, Kim WJ, és mtsai. Astaxanthin Improves Stem Cell Potency via an Increase in the Proliferation of Neural Progenitor Cells. *Int J Mol Sci*. 2010. december 9.;11(12):5109–19.
241. Lu Y, Xie T, He XX, Mao ZF, Jia LJ, Wang WP, és mtsai. Astaxanthin rescues neuron loss and attenuates oxidative stress induced by amygdala kindling in adult rat hippocampus. *Neurosci Lett*. 2015. június;597:49–53.
242. Nakagawa K, Kiko T, Miyazawa T, Carpennero Burdeos G, Kimura F, Satoh A, és mtsai. Antioxidant effect of astaxanthin on phospholipid peroxidation in human erythrocytes. *British Journal of Nutrition*. 2011. június 14.;105(11):1563–71.
243. Balendra V, Singh SK. Therapeutic potential of astaxanthin and superoxide dismutase in Alzheimer's disease. *Open Biol*. 2021. június 30.;11(6).
244. Preetam S, Jonnalagadda S, Kumar L, Rath R, Chattopadhyay S, Alghamdi BS, és mtsai. Therapeutic potential of lipid nanosystems for the treatment of Parkinson's disease. *Ageing Res Rev*. 2023. augusztus;89:101965.
245. Aoi W, Naito Y, Takanami Y, Ishii T, Kawai Y, Akagiri S, és mtsai. Astaxanthin improves muscle lipid metabolism in exercise via inhibitory effect of oxidative CPT I modification. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008. február;366(4):892–7.
246. Sztretye, Singlár, Szabó, Angyal, Balogh, Vakilzadeh, és mtsai. Improved Tetanic Force and Mitochondrial Calcium Homeostasis by Astaxanthin Treatment in Mouse Skeletal Muscle. *Antioxidants*. 2020. január 23.;9(2):98.
247. Feng B, Morley R, Jane D, Monaghan D. The effect of competitive antagonist chain length on NMDA receptor subunit selectivity. *Neuropharmacology*. 2005. március;48(3):354–9.
248. Peng HY, Chang HM, Chang SY, Tung KC, Lee SD, Chou D, és mtsai. Orexin-A modulates glutamatergic NMDA-dependent spinal reflex potentiation via inhibition of NR2B subunit. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2008. július;295(1):E117–29.
249. Takeda A, Itagaki K, Ando M, Oku N. Involvement of N-methyl-D-aspartate receptor subunits in zinc-mediated modification of CA1 long-term potentiation in the developing hippocampus. *J Neurosci Res*. 2012. március;90(3):551–8.

250. Nuno-Perez A, Mondoloni S, Tchenio A, Lecca S, Mameli M. Biophysical and synaptic properties of NMDA receptors in the lateral habenula. *Neuropharmacology*. 2021. szeptember;196:108718.
251. Reynolds IJ, Miller RJ. Ifenprodil is a novel type of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist: interaction with polyamines. *Mol Pharmacol*. 1989. november;36(5):758–65.
252. Davies J, Watkins JC. Actions of D and L forms of 2-amino-5-phosphonovalerate and 2-amino-4-phosphonobutyrate in the cat spinal cord. *Brain Res*. 1982. március;235(2):378–86.
253. Brancaccio M, Patton AP, Chesham JE, Maywood ES, Hastings MH. Astrocytes Control Circadian Timekeeping in the Suprachiasmatic Nucleus via Glutamatergic Signaling. *Neuron*. 2017. március;93(6):1420-1435.e5.
254. Dumont AO, Goursaud S, Desmet N, Hermans E. Differential Regulation of Glutamate Transporter Subtypes by Pro-Inflammatory Cytokine TNF- α in Cortical Astrocytes from a Rat Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS One*. 2014. május 16.;9(5):e97649.
255. Dunlop J, McIlvain HB, Carrick TA, Jow B, Lu Q, Kowal D, és mtsai. Characterization of Novel Aryl-Ether, Biaryl, and Fluorene Aspartic Acid and Diaminopropionic Acid Analogs as Potent Inhibitors of the High-Affinity Glutamate Transporter EAAT2. *Mol Pharmacol*. 2005. október;68(4):974–82.
256. Jabaudon D, Shimamoto K, Yasuda-Kamatani Y, Scanziani M, Gähwiler BH, Gerber U. Inhibition of uptake unmasks rapid extracellular turnover of glutamate of nonvesicular origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999. július 20.;96(15):8733–8.
257. Shimamoto K, Lebrun B, Yasuda-Kamatani Y, Sakaitani M, Shigeri Y, Yumoto N, és mtsai. DL-threo- β -Benzoyloxyaspartate, A Potent Blocker of Excitatory Amino Acid Transporters. *Mol Pharmacol*. 1998. február 1.;53(2):195–201.
258. Adamsky A, Kol A, Kreisel T, Doron A, Ozeri-Engelhard N, Melcer T, és mtsai. Astrocytic Activation Generates De Novo Neuronal Potentiation and Memory Enhancement. *Cell*. 2018. június;174(1):59-71.e14.
259. Han X, Chen M, Wang F, Windrem M, Wang S, Shanz S, és mtsai. Forebrain Engraftment by Human Glial Progenitor Cells Enhances Synaptic Plasticity and Learning in Adult Mice. *Cell Stem Cell*. 2013. március;12(3):342–53.
260. Oberheim NA, Goldman SA, Nedergaard M. Heterogeneity of Astrocytic Form and Function. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press; 2012. o. 23–45.
261. Syková E. Extrasynaptic volume transmission and diffusion parameters of the extracellular space. *Neuroscience*. 2004;129(4):861–76.
262. Syková E, Vargová L. Extrasynaptic transmission and the diffusion parameters of the extracellular space. *Neurochem Int*. 2008. január;52(1–2):5–13.

263. Mansvelder HD, Verhoog MB, Goriounova NA. Synaptic plasticity in human cortical circuits: cellular mechanisms of learning and memory in the human brain? *Curr Opin Neurobiol.* 2019. február;54:186–93.
264. Verhoog MB, Goriounova NA, Obermayer J, Stroeder J, Hjorth JJJ, Testa-Silva G, és mtsai. Mechanisms Underlying the Rules for Associative Plasticity at Adult Human Neocortical Synapses. *The Journal of Neuroscience.* 2013. október 23.;33(43):17197–208.
265. Inglebert Y, Debanne D. Calcium and Spike Timing-Dependent Plasticity. *Front Cell Neurosci.* 2021. szeptember 20.;15.
266. Mizuno T, Kanazawa I, Sakurai M. Differential induction of LTP and LTD is not determined solely by instantaneous calcium concentration: an essential involvement of a temporal factor. *European Journal of Neuroscience.* 2001. augusztus;14(4):701–8.
267. Sancho L, Contreras M, Allen NJ. Glia as sculptors of synaptic plasticity. *Neurosci Res.* 2021. június;167:17–29.
268. Falcón-Moya R, Pérez-Rodríguez M, Prius-Mengual J, Andrade-Talavera Y, Arroyo-García LE, Pérez-Artés R, és mtsai. Astrocyte-mediated switch in spike timing-dependent plasticity during hippocampal development. *Nat Commun.* 2020. szeptember 1.;11(1):4388.
269. Pereira MF, Amaral IM, Lopes C, Leitão C, Madeira D, Lopes JP, és mtsai. 1- α -aminoadipate causes astrocyte pathology with negative impact on mouse hippocampal synaptic plasticity and memory. *The FASEB Journal.* 2021. augusztus;35(8).
270. Lopes CR, Amaral IM, Pereira MF, Lopes JP, Madeira D, Canas PM, és mtsai. Impact of blunting astrocyte activity on hippocampal synaptic plasticity in a mouse model of early Alzheimer’s disease based on amyloid- β peptide exposure. *J Neurochem.* 2022. március 12.;160(5):556–67.
271. Hösli L, Binini N, Ferrari KD, Thieren L, Looser ZJ, Zuend M, és mtsai. Decoupling astrocytes in adult mice impairs synaptic plasticity and spatial learning. *Cell Rep.* 2022. március;38(10):110484.
272. Lia A, Sansevero G, Chiavegato A, Sbrissa M, Pendin D, Mariotti L, és mtsai. Rescue of astrocyte activity by the calcium sensor STIM1 restores long-term synaptic plasticity in female mice modelling Alzheimer’s disease. *Nat Commun.* 2023. március 22.;14(1):1590.
273. Guerra-Gomes S, Viana JF, Nascimento DSM, Correia JS, Sardinha VM, Caetano I, és mtsai. The Role of Astrocytic Calcium Signaling in the Aged Prefrontal Cortex. *Front Cell Neurosci.* 2018. november 5.;12.
274. Naranjo V, Contreras A, Merino B, Plaza A, Lorenzo MP, García-Cáceres C, és mtsai. Specific Deletion of the Astrocyte Leptin Receptor Induces Changes in Hippocampus Glutamate Metabolism, Synaptic Transmission and Plasticity. *Neuroscience.* 2020. november;447:182–90.

275. Park H, Han KS, Seo J, Lee J, Dravid SM, Woo J, és mtsai. Channel-mediated astrocytic glutamate modulates hippocampal synaptic plasticity by activating postsynaptic NMDA receptors. *Mol Brain*. 2015. február 3.;8(1):7.
276. Valtcheva S, Venance L. Astrocytes gate Hebbian synaptic plasticity in the striatum. *Nat Commun*. 2016. december 20.;7(1):13845.
277. Maltsev A, Roshchin M, Bezprozvanny I, Smirnov I, Vlasova O, Balaban P, és mtsai. Bidirectional regulation by “star forces”: Ionotropic astrocyte’s optical stimulation suppresses synaptic plasticity, metabotropic one strikes back. *Hippocampus*. 2023. január 9.;33(1):18–36.
278. Cavaccini A, Durkee C, Kofuji P, Tonini R, Araque A. Astrocyte Signaling Gates Long-Term Depression at Corticostriatal Synapses of the Direct Pathway. *The Journal of Neuroscience*. 2020. július 22.;40(30):5757–68.
279. Bellaver B, Souza DG, Souza DO, Quincozes-Santos A. Hippocampal Astrocyte Cultures from Adult and Aged Rats Reproduce Changes in Glial Functionality Observed in the Aging Brain. *Mol Neurobiol*. 2017. május 30.;54(4):2969–85.
280. Cerbai F, Lana D, Nosi D, Petkova-Kirova P, Zecchi S, Brothers HM, és mtsai. The Neuron-Astrocyte-Microglia Triad in Normal Brain Ageing and in a Model of Neuroinflammation in the Rat Hippocampus. *PLoS One*. 2012. szeptember 18.;7(9):e45250.
281. Goss JR, Finch CE, Morgan DG. Age-related changes in glial fibrillary acidic protein mRNA in the mouse brain. *Neurobiol Aging*. 1991. március;12(2):165–70.
282. Kohama SG, Goss JR, Finch CE, McNeill TH. Increases of glial fibrillary acidic protein in the aging female mouse brain. *Neurobiol Aging*. 1995. január;16(1):59–67.
283. Nichols NR, Day JR, Laping NJ, Johnson SA, Finch CE. GFAP mRNA increases with age in rat and human brain. *Neurobiol Aging*. 1993. szeptember;14(5):421–9.
284. David JP, Ghazali F, Fallet-Bianco C, Watzet A, Delaine S, Boniface B, és mtsai. Glial reaction in the hippocampal formation is highly correlated with aging in human brain. *Neurosci Lett*. 1997. október;235(1–2):53–6.
285. Rodríguez JJ, Yeh CY, Terzieva S, Olabarria M, Kulijewicz-Nawrot M, Verkhatsky A. Complex and region-specific changes in astroglial markers in the aging brain. *Neurobiol Aging*. 2014. január;35(1):15–23.
286. Robillard KN, Lee KM, Chiu KB, MacLean AG. Glial cell morphological and density changes through the lifespan of rhesus macaques. *Brain Behav Immun*. 2016. július;55:60–9.
287. Popov A, Brazhe A, Denisov P, Sutyagina O, Li L, Lazareva N, és mtsai. Astrocyte dystrophy in ageing brain parallels impaired synaptic plasticity. *Aging Cell*. 2021. március 6.;20(3).

288. Gómez-Gonzalo M, Martin-Fernandez M, Martínez-Murillo R, Mederos S, Hernández-Vivanco A, Jamison S, és mtsai. Neuron–astrocyte signaling is preserved in the aging brain. *Glia*. 2017. április 28.;65(4):569–80.
289. Lalo U, Bogdanov A, Pankratov Y. Diversity of Astroglial Effects on Aging- and Experience-Related Cortical Metaplasticity. *Front Mol Neurosci*. 2018. július 13.;11.
290. Lalo U, Palygin O, North RA, Verkhatsky A, Pankratov Y. Age-dependent remodelling of ionotropic signalling in cortical astroglia. *Aging Cell*. 2011. június;10(3):392–402.
291. Sun W, McConnell E, Pare JF, Xu Q, Chen M, Peng W, és mtsai. Glutamate-Dependent Neuroglial Calcium Signaling Differs Between Young and Adult Brain. *Science (1979)*. 2013. január 11.;339(6116):197–200.
292. Potier B, Billard JM, Rivière S, Sinet PM, Denis I, Champeil-Potokar G, és mtsai. Reduction in glutamate uptake is associated with extrasynaptic NMDA and metabotropic glutamate receptor activation at the hippocampal CA1 synapse of aged rats. *Aging Cell*. 2010. október;9(5):722–35.
293. Rădulescu AR, Todd GC, Williams CL, Bennink BA, Lemus AA, Chesbro HE, és mtsai. Estimating the glutamate transporter surface density in distinct sub-cellular compartments of mouse hippocampal astrocytes. *PLoS Comput Biol*. 2022. február 4.;18(2):e1009845.
294. Foster TC. Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain. *Aging Cell*. 2007. június;6(3):319–25.
295. Nava-Gómez L, Calero-Vargas I, Higinio-Rodríguez F, Vázquez-Prieto B, Olivares-Moreno R, Ortiz-Retana J, és mtsai. Aging-Associated Cognitive Decline is Reversed by D-Serine Supplementation. *eNeuro*. 2022. május;9(3):ENEURO.0176-22.2022.
296. Rajani V, Maziar A, Man KNM, Hell JW, Yuan Q. Age-Dependent Contributions of NMDA Receptors and L-Type Calcium Channels to Long-Term Depression in the Piriform Cortex. *Int J Mol Sci*. 2021. december 17.;22(24):13551.
297. Gramuntell Y, Klimczak P, Coviello S, Perez-Rando M, Nacher J. Effects of Aging on the Structure and Expression of NMDA Receptors of Somatostatin Expressing Neurons in the Mouse Hippocampus. *Front Aging Neurosci*. 2021. december 23.;13.
298. Liu XB, Murray KD, Jones EG. Switching of NMDA Receptor 2A and 2B Subunits at Thalamic and Cortical Synapses during Early Postnatal Development. *The Journal of Neuroscience*. 2004. október 6.;24(40):8885–95.
299. Law AJ, Weickert CS, Webster MJ, Herman MM, Kleinman JE, Harrison PJ. Expression of NMDA receptor NR1, NR2A and NR2B subunit mRNAs during development of the human hippocampal formation. *European Journal of Neuroscience*. 2003. szeptember;18(5):1197–205.

300. Hertelendy P, Varga DP, Menyhárt Á, Bari F, Farkas E. Susceptibility of the cerebral cortex to spreading depolarization in neurological disease states: The impact of aging. *Neurochem Int.* 2019. július;127:125–36.
301. Rau AR, Hentges ST. GABAergic Inputs to POMC Neurons Originating from the Dorsomedial Hypothalamus Are Regulated by Energy State. *The Journal of Neuroscience.* 2019. augusztus 14.;39(33):6449–59.
302. Jeong JH, Lee DK, Jo YH. Cholinergic neurons in the dorsomedial hypothalamus regulate food intake. *Mol Metab.* 2017. március;6(3):306–12.
303. Joly-Amado A, Cansell C, Denis RGP, Delbes AS, Castel J, Martinez S, és mtsai. The hypothalamic arcuate nucleus and the control of peripheral substrates. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2014. október;28(5):725–37.
304. Aponte Y, Atasoy D, Sternson SM. AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat Neurosci.* 2011. március 5.;14(3):351–5.
305. Atasoy D, Betley JN, Su HH, Sternson SM. Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature.* 2012. augusztus 11.;488(7410):172–7.
306. Williams KW, Elmquist JK. From neuroanatomy to behavior: central integration of peripheral signals regulating feeding behavior. *Nat Neurosci.* 2012. október 25.;15(10):1350–5.
307. McIntire SL, Reimer RJ, Schuske K, Edwards RH, Jorgensen EM. Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature.* 1997. október;389(6653):870–6.
308. Vong L, Ye C, Yang Z, Choi B, Chua S, Lowell BB. Leptin Action on GABAergic Neurons Prevents Obesity and Reduces Inhibitory Tone to POMC Neurons. *Neuron.* 2011. július;71(1):142–54.
309. Silver IA, Erecinska M. Glucose-Induced Intracellular Ion Changes in Sugar-Sensitive Hypothalamic Neurons. *J Neurophysiol.* 1998. április 1.;79(4):1733–45.
310. Song Z, Routh VH. Differential Effects of Glucose and Lactate on Glucosensing Neurons in the Ventromedial Hypothalamic Nucleus. *Diabetes.* 2005. január 1.;54(1):15–22.
311. Wang R, Liu X, Hentges ST, Dunn-Meynell AA, Levin BE, Wang W, és mtsai. The Regulation of Glucose-Excited Neurons in the Hypothalamic Arcuate Nucleus by Glucose and Feeding-Relevant Peptides. *Diabetes.* 2004. augusztus 1.;53(8):1959–65.
312. Wang R, Cruciani-Guglielmacci C, Migrenne S, Magnan C, Cotero VE, Routh VH. Effects of Oleic Acid on Distinct Populations of Neurons in the Hypothalamic Arcuate Nucleus Are Dependent on Extracellular Glucose Levels. *J Neurophysiol.* 2006. március;95(3):1491–8.
313. Mendoza C, Perez-Urrutia N, Alvarez-Ricartes N, Barreto GE, Pérez-Ordás R, Iarkov A, és mtsai. Cotinine Plus Krill Oil Decreased Depressive Behavior, and

- Increased Astrocytes Survival in the Hippocampus of Mice Subjected to Restraint Stress. *Front Neurosci.* 2018. december 17.;12.
314. Vohra MS, Benchoula K, Serpell CJ, Hwa WE. AgRP/NPY and POMC neurons in the arcuate nucleus and their potential role in treatment of obesity. *Eur J Pharmacol.* 2022. január;915:174611.

Tárgyszavak

Lassú inward áramok, asztrocita, glutamát felszabadulás, szinaptikus plaszticitás, nucleus arcuatus, neocortex, öregedés, astaxanthin,

Slow inward currents, astrocyte, glutamate-releasing, synaptic plasticity, arcuate nucleus, neocortex, ageing, astaxanthin

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni Prof. Dr. Csernoch Lászlónak, aki lehetőséget biztosított, hogy az Élettani Intézetben végezhessem munkámat. Hatalmas köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Pál Balázsnak, aki végigvezetett ezeken az éveken. Mindig bizalommal fordulhattam hozzá és szakmailag rengeteget tanulhattam tőle. Köszönöm neki azt a rengeteg segítséget, amellyel létrejöhett ez a munka. Szeretném megköszönni minden társszerzőnek, akik részt vettek a tudományos munkák publikációjában. Köszönöm Dr. Gönczi Mónikának, Dr. Sztretye Mónikának, Dr. Fodor Jánosnak, Prof. Dr. Nánási Péternek, Dr. Szentandrassy Norbertnek, Dr. Klekner Álmosnak és Dr. Szűcs Péternek. Hálával tartozom közvetlen munkatársaimnak Dr. Kovács Adrienn-nek, Baneen Maamrahnak, Dr. Tsogbadrakh Bayasgalannak, Dr. Deák-Pocsai Krisztinának, Dr. Korpás Kristófnak és Sokvári Cintióának, akik mindig támogattak és segítettek. Szeretném megköszönni az Élettani Intézet minden kedves munkatársának, köztük Barotáné Kovács Mónikának, akitől a legtöbb támogatást és lelkesítést kaptam. Szeretném megköszönni az egyetemen és PhD képzés alatt is hű társaimnak, hogy végig kísérték ideáig, név szerint Magyar Zsuzsanna Éduának, Szabó Lászlónak, Dr. Dienes Csabának és Dr. Kovács Zsigmondnak, nélkülük sosem jutottam volna el ideáig. Óriási hálával tartozom Bedőcs-Baráth Barbarának, aki 11 évig a lelki támaszom és legjobb barátom volt. És természetesen köszönöm szüleimnek, akik egész életemben lelkesítettek és támogattak, így eljuttatva engem a célig.



Nyilvántartási szám: DEENK/531/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Csemer Andrea
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10071339

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Csemer, A.**, Kovács, A., Maamrah, B., Pocsai, K., Korpás, K. L., Klekner, Á., Szűcs, P., Nánási, P. P., Pál, B.: Astrocyte- and NMDA receptor-dependent slow inward currents differently contribute to synaptic plasticity in an age-dependent manner in mouse and human neocortex. *Aging Cell.* 22 (9), e13939, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/accel.13939>
IF: 7.8 (2022)
2. Gönczi, M.*, **Csemer, A.***, Szabó, L., Sztretye, M., Fodor, J., Pocsai, K., Szenthe, K., Keller-Pintér, A., Köhler, Z. M., Nánási, P. P., Szentandrassy, N., Pál, B., Csernoch, L.: Astaxanthin Exerts Anabolic Effects via Pleiotropic Modulation of the Excitable Tissue. *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2), 917, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23020917>
* Megosztott első szerzős közlemény.
IF: 5.6

További közlemények

3. Maamrah, B., Pocsai, K., Bayasgalan, T., **Csemer, A.**, Pál, B.: KCNQ4 potassium channel subunit deletion leads to exaggerated acoustic startle reflex in mice. *Neuroreport.* 34 (4), 232-237, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/WNR.0000000000001883>
IF: 1.7 (2022)
4. Bayasgalan, T., Stupniki, S., Kovács, A., **Csemer, A.**, Szentesi, P., Pocsai, K., Dionisio, L., Spitzmaul, G., Pál, B.: Alteration of mesopontine cholinergic function by the lack of KCNQ4 subunit. *Front. Cell. Neurosci.* 15, 707789, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2021.707789>
IF: 6.147





5. Bayasgalan, T., **Csemer, A.**, Kovács, A., Pocsai, K., Pál, B.: Topographical Organization of M-Current on Dorsal and Median Raphe Serotonergic Neurons.
Front. Cell. Neurosci. 15, 614947, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2021.614947>
IF: 6.147
6. Kovács, A., Baksa, B., Bayasgalan, T., Szentesi, P., **Csemer, A.**, Pál, B.: Orexinergic actions modify occurrence of slow inward currents on neurons in the pedunculo-pontine nucleus.
Neuroreport. 30 (14), 933-938, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/WNR.0000000000001298>
IF: 1.394

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 28,788

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
13,4**

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, 2023.12.05.

