

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Patkány nucleus cochlearis dorsalis szemcse- és Purkinje-szerű sejtjeinek vizsgálata képalkotó és elektrofiziológiai módszerek kombinált alkalmazásával

Kőszeghy Áron

Témavezető: Dr. Rusznák Zoltán



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Élettan és Neurobiológia Program

Debrecen, 2013

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Rövidítések jegyzéke.....	3
Kulcsszavak.....	4
Keywords.....	4
Bevezetés.....	5
Irodalmi áttekintés.....	5
A hang és a hallószerv – általános áttekintés.....	5
A hallóidegrostok sorsa a nucleus cochlearisban és a hallópályák eredése.....	11
A somatosensoros és acusticus információ integrálása a nucleus cochlearis dorsalisban.....	14
A Purkinje-szerű sejtek.....	18
Kolinerg moduláció a nucleus cochlearisban.....	18
Célkitűzések.....	20
Anyagok és módszerek.....	22
Kísérleti állatok.....	22
Vegyszerek és oldatok.....	22
Túlélő agyszeletek preparálása.....	23
Teljes-sejtes konfigurációjú patch-clamp mérések – elektrofiziológia és biocitines jelölés.....	23
„Loose-patch” mérések.....	24
Az intracelluláris kalciumkoncentráció mérése.....	24
A kalciumkoncentráció-változások kiértékelése.....	25
Immunhisztokémia.....	27
Statisztikai módszerek.....	28
Eredmények.....	29
A nucleus cochlearis dorsalis Purkinje-szerű sejtjeinek vizsgálata.....	29
A Purkinje-szerű sejtek morfológiai jellemzése.....	29
A Purkinje-szerű sejtek membránsajátságai és posztzinaptikus áramai.....	33
Calbindin- és szinaptofizin-specifikus kettős immunjelölés.....	38
Calbindin- és glutamát-dekarboxiáz-specifikus kettős immunjelölés.....	40
Calbindin- és cerebellin-1-specifikus kettős immunjelölés.....	40
A nucleus cochlearis dorsalis szemcsesejtjeit befolyásoló kolinerg moduláció vizsgálata.....	42
A nucleus cochlearis dorsalisban kialakuló kalciumtranziensek jellemzése.....	43
A kalciumtranziensek kvantitatív jellemzése.....	45
Karbakol hatása a nucleus cochlearis dorsalis szemcsesejtjeinek aktivitására.....	47
M1- és M3-típusú muszkarinos receptorok szerepe a kolinerg hatás közvetítésében.....	54
Megbeszélés.....	59
A nucleus cochlearis dorsalis Purkinje-szerű sejtjei vonatkozásában leírt új adatok, és azok jelentősége.....	59
A nucleus cochlearis dorsalis szemcsesejtjeihez kapcsolódó új eredmények, és azok jelentősége.....	62
Kalciumkoncentráció-mérés a nucleus cochlearisból készített túlélő agyszeletben.....	63
A nucleus cochlearis dorsalis szemcsesejtjeinek kolinerg modulációja.....	64
A disszertáció legfontosabb megállapításai.....	68
Összefoglalás.....	69
Summary.....	71
Irodalomjegyzék.....	73
Közlemények listája.....	80
Köszönetnyilvánítás.....	81

Rövidítések jegyzéke

4-DAMP	1,1-Dimetil-4-difenilacetoxipiperidiniumjodid
3G-koktél	a glutamaterg, glicinerg és GABAerg neurotranszmissziót gátló oldat
aCSF	művi cerebrospinalis folyadék (<i>artificial cerebrospinal fluid</i>)
AP	akciós potenciál
AM	acetoxi-metilészter
AMP	amplitúdó
CCD	fényérzékeny szenzor (<i>charge-coupled device</i>)
CCh	karbamil-kolin
CI	colliculus inferior
CN	nucleus cochlearis (<i>cochlear nucleus</i>)
D-AP5	D-2-amino-5-foszfonopentanoát
DAS	stria acustica dorsalis (<i>dorsal acoustic stria</i>)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DCN	nucleus cochlearis dorsalis (<i>dorsal cochlear nucleus</i>)
DMSO	dimetil-szulfoxid
EPSC	serkentő hatású posztszinaptikus áram (<i>excitatory postsynaptic current</i>)
Fd	zajszűrt fluoreszcenciajel
FITC	fluorszcein-izotiocianát
GAD	glutamát-dekarboxiláz
GABA	γ -aminovajsav (<i>γ-aminobutyric acid</i>)
IAS	stria acustica intermedia (<i>intermediate acoustic stria</i>)
IPSC	gátló hatású posztszinaptikus áram (<i>inhibitory postsynaptic current</i>)
LSO	oliva superior lateralis (<i>lateral superior olive</i>)
M1	muszkarinos kolinerg receptor, 1-es altípus
M3	muszkarinos kolinerg receptor, 3-as altípus
M5	muszkarinos kolinerg receptor, 5-ös altípus
MNTB	nucleus corporis trapezoidei (<i>medial nucleus of trapezoid body</i>)
MSO	oliva superior medialis (<i>medial superior olive</i>)
NBQX	2,3-dihidroxi-6-nitro-7-szulfamoil-benzo[f]quinoxalin-2,3-dion
OGB	Oregon Green BAPTA-1
OGB-AM	Oregon Green BAPTA-1 acetoxi-metilészter
PB	foszfátpuffer
PBS	foszfát-pufferelt sóoldat
PFA	paraformaldehid
PLC	Purkinje-szerű sejt (<i>Purkinje-like cell</i>)
PO	periolivaris magvak
POL	lateralis periolivaris magvak
POV	ventralis periolivaris magvak
ROI	vizsgált terület (<i>region of interest</i>)
RT50	félrelaxációs idő
RT80	az amplitúdó 80%-ának eléréséhez szükséges visszatérési idő
TBS	tris-pufferelt sóoldat
TTP	a maximum eléréséhez szükséges idő (<i>time-to-peak</i>)
TTX	tetrodotoxin
VCN	nucleus cochlearis ventralis (<i>ventral cochlear nucleus</i>)
VAS	stria acustica ventralis (<i>ventral acoustic stria</i>)
ZD7288	N-etil-1,2-dimetil-6-metilimino-N-fenilpirimidin-4-amin

Kulcsszavak

Hallás, Nucleus cochlearis dorsalis, Immunhisztokémia, Cerebellin, GAD, Patch-clamp, Posztszinaptikus áram, ZD7288, Intracelluláris kalciumkoncentráció-mérés, Kalciumtranziens, Kolinerg moduláció, Muszkarinos-receptoraltípusok, Pirenzepin, 1,1-Dimetil-4-difenilacetoxipiperidiniumjodid

Keywords

Hearing, Dorsal cochlear nucleus, Immunohistochemistry, Cerebellin, GAD, Patch-clamp, Postsynaptic current, ZD7288, Calcium imaging, Calcium transient, Cholinergic modulation, Muscarinic receptor subtypes, Pirenzepine, 1,1-Dimethyl-4-diphenylacetoxypiperidiniumiodide

Bevezetés

Irodalmi áttekintés

A hang és a hallószerv – általános áttekintés

A hang a hallószervet körülvevő közegben terjedő, a hallástartományon belül eső frekvenciával és amplitúdóval jellemezhető nyomáshullámok sorozata. Emlősökben a hang érzékelésére specializálódott struktúra a belső fülben található Corti-féle szerv. A hanginger egy bonyolult transzdukciós folyamat eredményeként a belső szőrsejtekből glutamátot szabadít fel, ami depolarizálja a ganglion spirale neuronok perifériás nyúlványait. Az így kialakuló receptorpotenciál akcióspotenciál- (AP) sorozat tüzelését váltja ki, ami a ganglion spirale neuronok perifériás nyúlványán, sejtestén és centrális nyúlványán végighaladva a nucleus cochlearisba (CN) kerül. Ezen anatómiai elrendezésből következően a CN jelenti a központi hallópályák kiindulási pontját. A neuronális aktivitás végül egy szövevényes útvonalat bejárva az elsődleges hallókérget is eléri, és ekkor alakul ki a hangérzet.

A hanginger számos tulajdonságát képesek vagyunk felismerni, egyebek között annak intenzitását és frekvenciáját, valamint a hangszínt és a hangforrás térbeli helyzetét. Az intenzitás (hangerő) és a frekvencia (hangmagasság) dekódolása már a periférián megkezdődik, ugyanakkor a hangforrás térbeli lokalizációjának meghatározása kizárólag a központi idegrendszerben történik.

A hangerő döntően a hangérzetet kialakító nyomáshullám amplitudójától függ. Az emberi fül, optimális esetben, a $20\text{--}20 \times 10^6 \mu\text{Pa}$ tartományba eső nyomáshullámokat képes hangingerként érzékelni (Fonyó, 1999). A hallásküszöb pontos értéke frekvenciafüggő, és a megjelölt $2 \times 10^{-5} \text{ Pa}$ (vagy $10^{-12} \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$) érték csak azon frekvenciatartományon belül érvényes, amire az emberi fül a legérzékenyebb (1000–4000 Hz). Annak érdekében, hogy az igen széles határok között változó intenzitásértékek is könnyen kezelhetővé váljanak, a hangerő számszerűsítésére logaritmikus skálát használunk, melynek egysége a decibel (dB). A konvenció szerint egy ép hallású egyén hallásküszöbének megfelelő hanginger ($2 \times 10^{-5} \text{ Pa}$ amplitúdó, 2 kHz frekvencia) decibel skálán elfoglalt erőssége 0 dB. A hallásküszöböt nem lényegesen meghaladó, emelkedő nagyságú hangnyomás hatására az egyes belső szőrsejteken kialakuló receptorpotenciál mértéke nő, miközben egyre nagyobb számú érzéksajt aktiválódik; megteremtve ezzel a hangerősség szubjektív érzékelésének alapját.

A hangmagasság a hangérzetet kialakító longitudinális rezgés frekvenciájától függ. Az emberi fül a 20–20000 Hz-es frekvenciatartományba eső rezgéseket érzékeli hangként. A

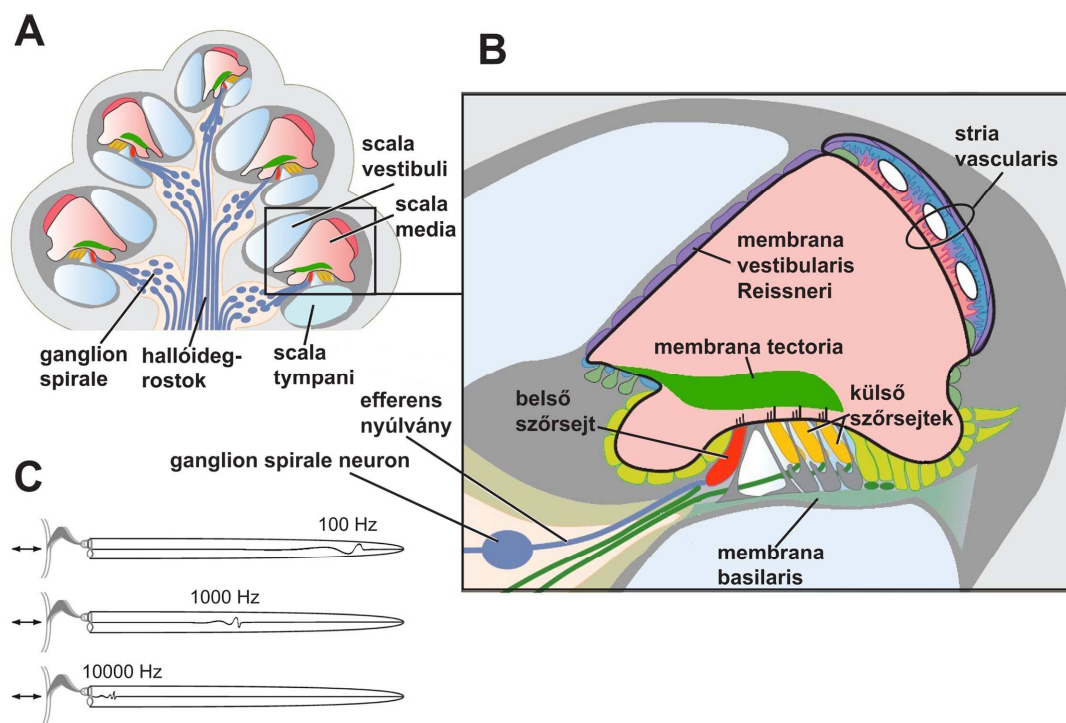
megadott tartományon belül a kisebb frekvenciájú hangokat mélyebbnek, a nagyobb frekvenciájukat pedig magasabbnak érzékeljük.

A hangokat frekvenciaösszetételük alapján három csoportba sorolhatjuk. Az egyetlen frekvenciával leírható longitudinális rezgést *tiszta hang*nak nevezzük. A tiszta hangok jórészt speciális berendezéssel (szintetizátor) generálhatók, így a természetben igen ritkán fordulnak elő. A *zenei hangok* egy alaphangból és annak felharmónikusaiból (felhangok) állnak. A felhangok frekvenciája az alaphang frekvenciájának egész számú többszöröse. A különböző hangszerek vagy akár az egyes emberek hangjának megkülönböztethetősége azon alapszik, hogy eltér az alaphangra rakódó felhangok száma, frekvenciája és intenzitása – azaz a hangszíne. A hangok harmadik csoportját a *zörejek* alkotják. A zöreje olyan összetett hang, ami nem harmónikus részhangokból áll. Az összetett hangrezgések elemekre bontása és a frekvenciát hordozó információ továbbítása ugyancsak a belső fülben kezdődik meg, részben a tonotópia, részben a fáziscsatolás elvének érvényesítésével.

A hallás egy olyan bonyolult transzdukciót kívánó folyamat, aminek során a külső hallójáratban található levegő rezgése, a középfül közreműködésével, a belső fülben elhelyezkedő cochlea folyadéktartóinak rezgésévé alakul. Minden közegnek speciális ellenállása van a rá hatást gyakorló longitudinális rezgéssel szemben, ezt *akusztikus impedanciának* nevezünk. Mivel a folyadékok akusztikus impedanciája lényegesen nagyobb, mint a gáznemű anyagoké, a levegő-folyadék közegetáron (azaz a középfül légterét és a cochlea folyadékterét elválasztó felszínen, amit fiziológiai körülmények között a kengyel talpa borít) jelentős visszaverődés és következményes amplitudócsökkenés alakulna ki. A középfül hallócsontocskáinak egyik feladata, hogy segítik a hangenergia áttevődését a külső fül levegő- és a belső fül folyadéktere között (*impedanciaillesztés*). A középfül további fontos funkciója, hogy a hallócsontocskák emelőszerű elrendeződéséből, valamint a dobhártya és a kengyel talpának felszíne közötti különbségből fakadóan jelentősen megnöveli a belső fül folyadéktartóit elérő nyomást. Ez a nyomásfokozódás a rezgések maximális kitérésének csökkenése árán következik be. A középfül által biztosított impedanciaillesztés és nyomásfokozódás kombinált hatásának eredményeként a hallásküszöb jelentősen csökken.

A cochlea az os temporale pars petrosajanak csiga alakban felcsavarodott ürege, melyet három párhuzamosan futó, szintén csiga alakban csavarodott hártáras csatorna (scala) tölt ki (1A ábra). A scala vestibuli a cochlea bázisán a fenestra vestibulival kezdődik, majd a cochlea csúcán a helicotrema-ban átfordul a scala tympani-ba, mely a csiga bázisánál a fenestra cochleae-val végződik. A scala vestibuli és tympani közé ékelődik a mindkét végén zárt scala media. A scala vestibulit a scala médiától a membrana vestibularis Reissneri, míg a scala

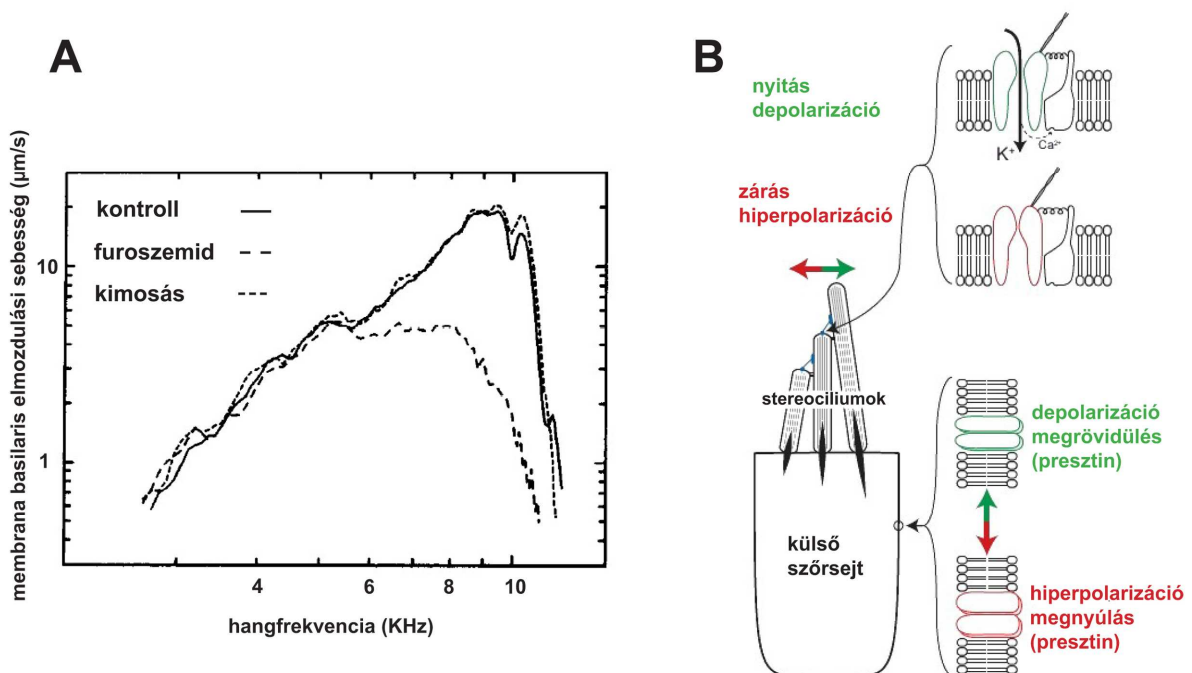
mediát a scala tympanitól a membrana basilaris választja el. A szőrsejtek (azaz a hallás tulajdonképpeni érzékszervei) a membrana basilaris támasztósejtjei közé ékelődve, több sorban helyezkednek el. Miközben a belső szőrsejtek mindig egy sort alkotnak, a külső szőrsejtek a cochleán belüli pozíciójuktól függően három vagy négy sort alkotnak (1B ábra). A szőrsejtek egy kino- és több stereociliumot hordozó apicalis felszíne a scala media, basolateralis membránjuk pedig a scala tympani felé tekint (Röhlich, 1999). A scala mediát endolympha tölti ki, aminek összetétele sok szempontból emlékeztet az intracellularis folyadékéra – azaz magas kálium-, alacsony nátrium- és elhanyagolható kalciumkoncentrációval jellemezhető. A scala vestibuli és tympani egymással összefüggő folyadékterében perilympha található, aminek ionösszetétele nem különbözik jelentősen a vérplazmától. Az eltérő ionösszetétel miatt az endolympha és perilympha közt potenciálkülönbség mérhető, melyet *endocochlearis potenciálnak* nevezünk. Az endocochlearis potenciál mértéke +80 mV (az endolympha pozitívabb). A szőrsejtek nyugalmi membránpotenciálja (ti. a perilympha és az intracellularis tér között fennálló feszültség) -70 mV. Elemi megfontolásból következően tehát a szőrsejtek belseje és az endolympha között -150 mV elektromos potenciál mérhető.



1. ábra. A belső fül felépítésének és működésének alapjai. (A) A cochlea szerkezetét bemutató sematikus ábra. (B) A Corti-féle szerv vázlata, a cochlea (A) panelen fekete téglalappal kiemelt részének nagyított képe. Az (A) és (B) panelek Zdebik (2009) alapján lettek újrarajzolva. (C) Tonotópia a cochleán belül (Hudspeth és mtsai., 2010 alapján). A hang rezgésbe hozza a cochlea folyadéktereiben elhelyezkedő folyadékot, ez a rezgés „vándorlóhullámot” alakít ki a membrana basilarison. A vándorlóhullám legnagyobb kitérése magas hangok esetén a cochlea bázisához, mély hangok esetén a cochlea csúcsához esik közelebb.

A cochlea belső csontos tengelye (*modiolus*) felől egy harmadik membrán, a membrana tectoria, nyúlik be a membrana vestibularis Reissneri és a membrana basilaris közé, azaz a szőrsejtek fölé. Ahogy a hanghullámok megrezegtetik a dobhártyát, a rezgés a kalapácson és az üllőn keresztül áttevődik a kengyelre, melynek talpa a fenestra vestibuliban ki-be mozogva longitudinális rezgésbe hozza a scala vestibulit kitöltő perilympa folyadékreszecskeit. A rezgés miatt nyomáshullám halad végig a scala vestibulin a cochlea csúcsa irányába. Az egymás után érkező nyomáshullámok rezgésbe hozzák a membrana basilarist és olyan vándorlóhullámot alakítanak ki rajta, aminek a legnagyobb kitérése a hang frekvenciájától függően a cochlea eltérő szakaszaira esik (1C ábra). Ebből következik, hogy a különböző frekvenciájú hangok más és más belső szőrsejt-populációkat aktiválnak a membrana basilaris mentén. A jelenség (*tonotópia*) a frekvenciadiszkrimináció egyik lényeges eleme. A magas hangok által keltett hullám kitérésének maximuma a cochlea bázisa, a mély hangoké pedig a cochlea csúcsa közelében alakul ki (Békésy, 1960; Robles és Ruggero, 2001). A maximális kitérés helyének ezen frekvenciafüggése részben azzal magyarázható, hogy a membrana basilaris merevsége a cochlea bázisától a helicotrema felé haladva csökken (Emadi és mtsai., 2004), így az egyes membrana basilaris szakaszoknál más és más az a rezgési frekvencia, ami a kérdéses szakaszokat rezonanciára készíti. A membrana basilaris változó mechanikai tulajdonságáért részben annak változó szélessége, részben a benne található kötőszövetes rostok változó hossza és vastagsága felelős. A cochlea bázisánál a membrana basilaris keskeny (kb. 100 μm), míg a cochlea csúcsa felé fokozatosan szélesedik (a helicotremánál kb. 500 μm). A membrana basilarisban található kötőszövetes rostok keresztirányúak, és egyik végük a limbus laminae spirálisához rögzül. A rostok hossza a helicotrema felé haladva nő, vastagságuk pedig csökken (Iurato, 1962; Röhlich, 1999; Dreiling és mtsai., 2002; Wenzel és mtsai., 2004). Rhode és munkatársai (1971) számoltak be arról, hogy élő egyedekben vizsgálva jelentősen nagyobb a membrana basilaris maximális kitérése, mint tetemekben (a téma részletes áttekintését lásd: Robles és Ruggero, 2001). A megfigyelésből arra következtettek, hogy a cochleán belül létezik egy olyan erősítő mechanizmus, ami az eredetileg Békésy által *ex vivo* leírt vándorlóhullám maximuma közelében még nagyobbá teszi a membrana basilaris kitérését, azaz csökkenti a hallásküszöböt és pontosabbá teszi a cochlea hangolását. Bebizonyosodott, hogy ezen erősítésért a külső szőrsejtek felelősek (Ruggero és Rich, 1991; 2A ábra), amik membránpotenciáljuk megváltozásának hatására változtatják a hosszukat (Brownell és mtsai., 1985). A membrana basilaris kitérésekor a külső szőrsejtek sztereociliumai a kinocilium irányába hajlanak, így a tiplinkkel összekötött ciliumvégek membránja megfeszül, aminek következtében az itt elhelyezkedő

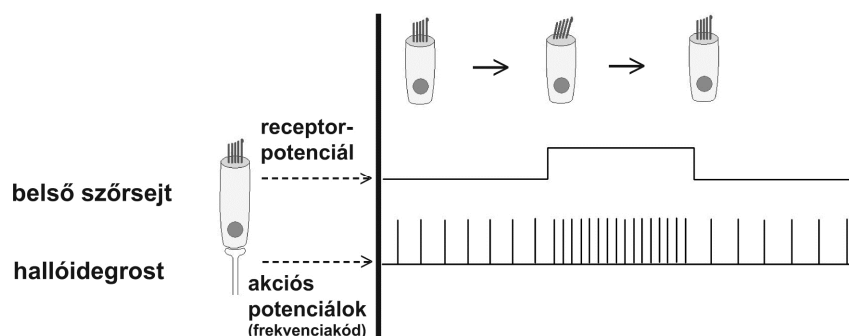
mechanoszenzitív kationcsatornák megnyílnak (2B ábra). A fennálló mintegy 150 mV-os potenciálkülönbség hatására káliumionok áramlanak az endolymphából a sejtbe, és depolarizálják azt. A depolarizáció következtében a sejthártya feszültségérzékeny motorfehérjéi, a presztinmolekulák megrövidülnek és megrövidítik a sejtet (*elektromotilitás*). Mivel a presztinmolekulák hossza közvetlenül a membránpotenciáltól függ, a sejt megrövidülése és azt követő megnyúlása kalciumfüggetlen, ezáltal igen gyorsan bekövetkezik (Zheng és mtsai., 2000; Dallos és mtsai., 2008; Guinan és mtsai., 2012). A folyamat eredményeként a vándorlóhullám maximumának helyén a külső szőrsejtek elektromotilitása növeli a kitérést. A hipotézis helyességét megerősíti, hogy presztin-génkiütött egerek vizsgálata során mintegy 40 dB-es halláscsökkenést és a külső szőrsejtek elektromotilitásának megszűnését tapasztalták (Liberman és mtsai., 2002; Dallos és mtsai., 2008). Bár egyes szerzők valószínűsítik, hogy a külső szőrsejtek a membrana basilaris adott szakaszán a hang frekvenciájával megegyező frekvenciával húzódnak össze és nyúlnak meg, több tanulmány megkérdőjelezi, hogy a külső szőrsejtek valóban képesek-e ilyen nagy frekvenciájú elektromotilitásra (Lu és mtsai., 2006; Ashmore, 2008; Johnson és mtsai., 2011; Guinan és mtsai., 2012).



2. ábra. A külső szőrsejtek növelik a vándorlóhullám kitérésének mértékét a maximumhely közvetlen közelében. (A) A membrana basilaris elmozdulási sebessége a cochlea adott szakaszán (3,5 mm távolságban a fenestra vestibulitól), különböző hangfrekvenciák esetén, 75 dB hangerő mellett. Az elmozdulási sebességet lézer velocimetriával határozták meg. A folytonos vonal kontroll körülmények között (*in vivo*, altatott állat), a szaggatott vonal furoszemid jelenlétében, a rövid-szaggatott vonal pedig 100 perccel a furoszemid alkalmazást követően mutatja az elmozdulási sebességet a hangfrekvencia függvényében. A furoszemid csökkenti az endolympha káliumkoncentrációját és az endocochlearis potenciált, továbbá közvetlenül gátolja a külső

szőrsejtek motilitását. Látható hogy a külső szőrsejtek motilitásának gátlása reverzibilisen csökkenti a membrana basilaris elmozdulási sebességét. Érdemes felhívni a figyelmet az ordináta tengely logaritmikus beosztására. Az ábra forrása: Ruggero és Rich, 1991. **(B)** A külső szőrsejtek motilitása a sejtthártyában elhelyezkedő presztinmolekulák megnyúlása és megrövidülése által valósul meg. Ezen molekulák hossza közvetlenül a membránpotenciáltól függ. A membránpotenciál a stereociliumok elmozdulásával változik. A stereociliumoknak a kinocilium irányába történő elmozdulása mechanoszenzitív ioncsatornákat nyit és depolarizálja a szőrsejtet; ellenkező irányú elmozdulás pedig hiperpolarizál. Az ábra forrása: Guinman és mtsai., 2012.

A belső szőrsejtek apicalis felszíne a külső szőrsejtekéhez hasonló felépítésű, így a membrana tectoriával való fizikai érintkezés itt is azonos módon okoz depolarizációt (3. ábra). A depolarizáció hatására feszültségfüggő, depolarizáció hatására aktiválódó csatornák nyílnak meg a basolateralis membránban, ami tovább depolarizálja a sejtet és receptorpotenciál kialakulásához vezet. A depolarizáció feszültségfüggő kalciumcsatornákat aktivál, amiken keresztül a perilympa folyadékteréből Ca^{2+} -ionok áramlanak a sejtbe, előidézve az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció emelkedését. A megnövekedett kalciumkoncentráció a serkentő hatású neurotranszmitter, glutamát felszabadulását okozza. A belső szőrsejteken nem alakul ki AP, a glutamát felszabadulását közvetlenül a receptorpotenciál hatására megemelkedő intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció okozza. A belső szőrsejtekből felszabaduló glutamát a ganglion spirale sejtek perifériás nyúlványait depolarizálja. A jel analóg-digitális átalakítása tehát a ganglion spirale sejtek perifériás nyúlványának végén történik meg, ahol a glutamát által kiváltott posztszinaptikus potenciál akcióspotenciál-sorozatot vált ki. A ganglion spirale sejtek centrális nyúlványai által alkotott hallóidegrostokról időegység alatt elvezethető akciós potenciálok száma a hangerő emelkedésével nő; részben az egy rostról elvezethető akcióspotenciál-frekvencia, részben az aktiválódó rostok számának fokozódása miatt.



3. ábra. A belső szőrsejtekből felszabaduló glutamát növeli a hallóidegrostok AP-frekvenciáját. A vándorlóhullám legnagyobb kitérésének helyén a membrana tectoria a belső szőrsejtek stereociliumait a kinocilium irányába mozdítja el. Ilyen irányú stereociliumelmozdulás mechanoszenzitív csatornákat nyit és depolarizálja a sejtet. A depolarizáció glutamátfelszabadulást okoz a sejt bazális oldalán, ami megnöveli az adott belső szőrsejttel szinaptizáló hallóidegrostok akcióspotenciál-tüzelési frekvenciáját.

A nervus acusticus rostjairól még ingerlés (hang) hiányában is vezethetők el akciós potenciálok, azaz a ganglion spirale neuronok spontán aktivitást mutatnak. A rostok egy részénél a spontán tüzelési frekvencia alacsony, míg más rostok spontán AP frekvenciája nagyobb. A belső szőrsejtek aktiválása során ezen spontán AP-frekvenciához képest növekedik meg az egyes acusticus rostok aktivitása.

Egy ganglion spirale sejt csak egy belső szőrsejttel szinaptizál. Ebből következik, hogy a tonotópia a ganglion spirale sejtek és axonjaik szintjén is megtartott, azaz minden hallóidegrosthoz rendelhető egy „saját” (vagy karakterisztikus) hangfrekvencia. Az emberi fülben oldalanként kb. 3000–4000 belső szőrsejt van, amikhez mintegy 31000 ganglion spirale sejt csatlakozik; következésképp egy belső szőrsejttel kb. 10 ganglion spirale neuron létesít szinaptikus kapcsolatot. Érdeemes rámutatni, hogy az ugyanazon belső szőrsejttel szinaptizáló akusztikus rostok glutamátérzékenysége különböző, ami hozzájárul az emberi hallószervet jellemző igen széles dinamikus spektrumhoz (Lieberman, 1982; Merchan-Perez és Liberman 1996; Ryugo és Parks, 2003). Az eltérő glutamátérzékenység hátterében az eltérő felszínű posztzinaptikus denzitás állhat (Lieberman és mtsai., 2011). Általánosságban elmondható, hogy a kis spontán AP-frekvenciát mutató rostok glutamátérzékenysége nagyobb, mint a nagy frekvenciájú intrinsic aktivitást mutató axonoké, így a legalacsonyabb intenzitású hangokra az előbbiek reagálnak (Schmiedt, 1989). Kellően mély hangok esetében a nervus acusticus akciós potenciáljai a nyomáshullámok csúcsának megfelelő időpontban jelennek meg a legnagyobb számban (*fáziscsatolás*). A fáziscsatolás jelensége értékes segítséget nyújt a hangingerek frekvenciájának és a hangforrás lokalizációjának meghatározásához egyaránt.

A ganglion spirale sejtek centrális nyúlványai alkotják *nervus cochlearis* (vagy *nervus acusticus*) és a hozzá csatlakozó három vestibularis ideg alkotja a nyolcadik agyideget (*nervus statoacusticus* vagy *vestibulocochlearis*). A nervus vestibulocochlearis a nyúltvelő-híd határon, ventral felől éri el az agytörzset, ahol az acusticus és vestibularis rostok külön kötegre oszlanak. A vestibularis rostok a vestibularis magvakhoz, míg a hallóideg rostjai a nucleus cochlearishoz tartanak (Szentágothai és Réthelyi, 2006).

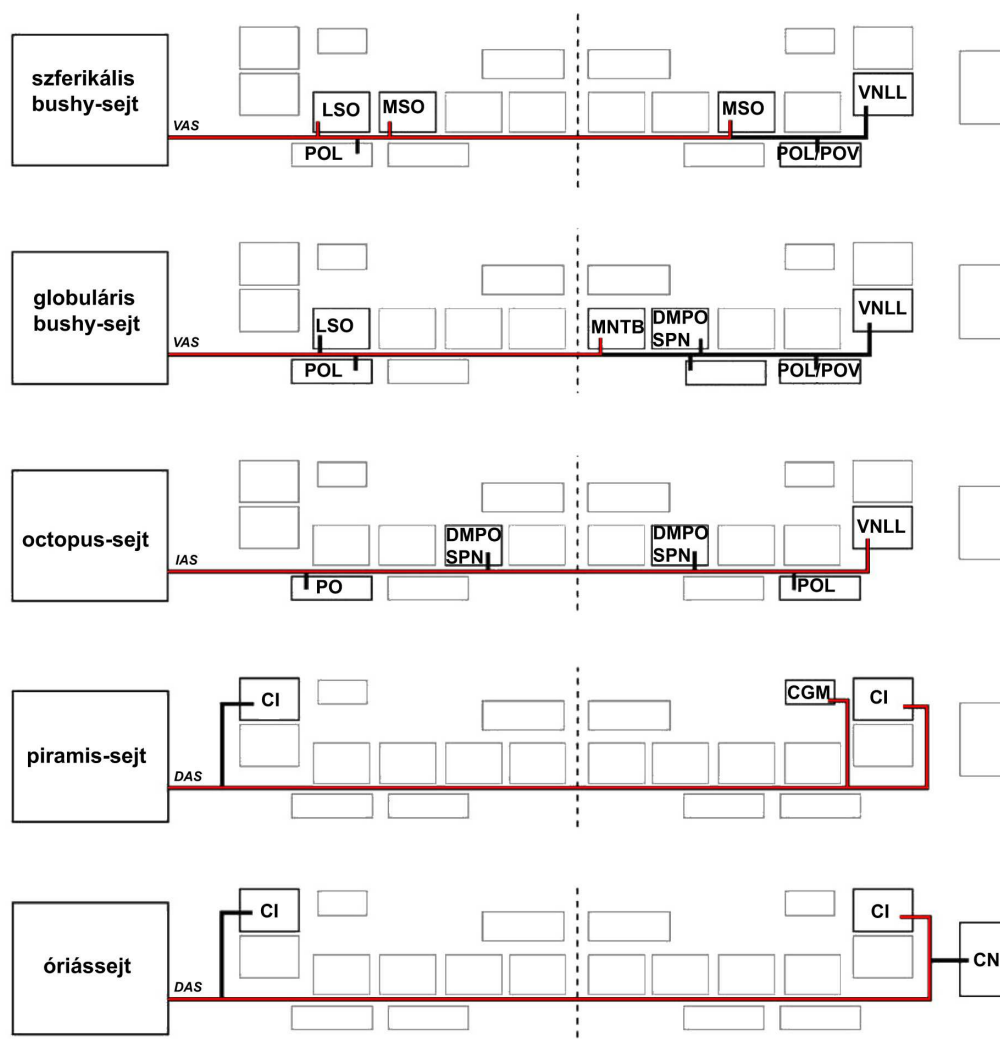
A hallóidegrostok sorsa a nucleus cochlearisban és a hallópályák eredése

Rágcsálókban a nucleus cochlearis a nyúltvelő-híd határon, az agytörzs laterális felszínén található. A mag két fő részre osztható, ezek a nucleus cochlearis ventralis (VCN) és dorsalis (DCN). A VCN-en belül elkülöníthető még a nucleus cochlearis anteroventralis és posteroventralis. A DCN a nucleus cochlearis posteroventralishoz dorsalis irány felől

kapcsolódik. Helyzetéből fakadóan a DCN csak a kisagy eltávolítása után, az agytörzs dorsalis oldala felől, a fossa rhomboidea recessus laterálisában válik láthatóvá (Paxinos és Watson, 2007). A CN kizárólag monaurális bemenettel rendelkezik, azaz csak az azonos oldali ganglion spiraleből érkező acusticus rostok érik el. A CN a hallóidegen kívül több más bemenettel is rendelkezik, így – egyebek között – információt kap az olivocochlearis kötegtől, a colliculus inferiorból, a hallókéregtől, az ellenoldali CN-től, a ganglion vestibularetől, a vestibularis magvaktól, a trigeminus magtól és a nucleus cuneatustól (Brown és mtsai., 1988; Caceido és Herbert, 1993; Weedman és Ryugo, 1996; Schofield és Coomes, 2005; Burian és Gstoettner 1988; Bukowska 2002; Zhan és mtsai., 2006). A nervus vestibulocochlearis acusticus rostjai a VCN-be történő belépésük után azonnal kettéágaznak. A felszálló ágak a CN anteroventralis, a leszálló kollaterálisok pedig a CN posteroventralis és dorsalis részébe futnak (Osen, 1969; Brawer és Moore, 1975; Fekete és mtsai., 1984). Mind a VCN-ben, mind a DCN-ben végződő acusticus rostok mutatják a tonotópia-cochleotópia elve szerinti rendeződést (Fekete és mtsai., 1984; Ryugo és May, 1993). A nucleus cochlearison belül minden acusticus információt hordozó rost átkapcsolódik, így a beérkező aktivitási mintázatok új sejtre vagy sejtekre tevődnek át. A nyolcadik agyideg rostjainak elágazásával a CN-ban kezdődik meg a hallópálya divergálása, azaz a hallási információ szétosztása több, párhuzamos feldolgozó rendszer között. A rendszer elrendezéséből fakadóan a nucleus cochlearisba érkező aktivitás több csatornán jut el a colliculus inferiorig, ahol ezen csatornák konvergálásával a hallási információ továbbítása újra egy csatornán keresztül zajlik, és a corpus geniculatum mediale közbeiktatásával éri el a hallókérget.

A nucleus cochlearis összetett cytoarchitektúrával jellemzhető struktúra, amit jól példáz, hogy Lorente de Nó tanulmányában 40–50 sejttípust vélt elkülöníteni (Lorente de Nó, 1933). A mag egyes jellegzetes sejttípusainak részletes vizsgálata Nissl- és Glees-festés (Osen, 1969), valamint Golgi-impregnációs technika alkalmazásával történt (Brawer és mtsai., 1974). A CN egyes sejttípusainak nomenklatúrája a mai napig ezeken a régi, ám igen körültekintő és részletes tanulmányokra épül. A VCN legfontosabb projekciós neuronjai a szferikális bushy-, globuláris bushy-, octopus- és stellate-sejtek. Az utóbbi sejtcsoport nem egységes, inkább afféle gyűjtőfogalomnak tekinthető. A projekciós sejteken kívül számos interneuron-féleséget is dokumentáltak, egyebek között a Golgi- és a szemcsesejteket. A DCN projekciós neuronjai a piramis- (vagy fusiform) és az óriássejtek. A DCN számos interneuronnak is helyet ad, egyebek között találhatók itt cartwheel-, Golgi-, és szemcsesejtek. Igen jellegzetes, döntően a DCN-ben előforduló sejtalak a Purkinje-szerű sejt, aminek részletes bemutatása külön fejezetben történik. Érdekes azonban már itt rámutatni, hogy ezen sejttípus esetében még

arról sincsen egyetértés az irodalomban, hogy vajon axonjai elhagyják-e a nucleus cochlearis területét; azaz projekciós- vagy interneuronok-e.



4. ábra. A nucleus cochlearis egyes sejtípusainak legfontosabb projekciói. A CN neuronjainak axonjai három rostkötegen keresztül hagyják el a magot: stria acustica ventralis (VAS), stria acustica intermedia (IAS) és stria acustica dorsalis (DAS). A legfontosabb projekciókat piros színnel emeltük ki. Az ábrán alkalmazott rövidítések a következő idegmagokat jelölik: corpus geniculatum mediale (CGM), colliculus inferior (CI), nucleus cochlearis (CN), dorsalis periolivaris magvak (DMPO), oliva superior lateralis (LSO), nucleus medialis corporis trapezoidei (MNTB), oliva superior medialis (MSO), periolivaris magvak (PO), lateralis periolivaris magvak (POL), ventralis periolivaris magvak (POV), nucleus paraolivaris superior (SPN) és nucleus ventralis lemnisci lateralis (VNLL). Az ábra Cant és Benson (2003) alapján készült.

A nucleus cochlearis projekciós neuronjai több magasabb rendű hallómagba is projiciálnak; axonjaik három útvonalon – stria acustica ventralis vagy corpus trapezoideum, stria acustica intermedia és stria acustica dorsalis – érik el célpontjaikat (4. ábra). A stria acustica ventralist túlnyomó részben a bushy-sejtek axonjai képezik, amik az oliva superiorhoz és az ellenoldali lemniscus lateralis magvakhoz tartanak (Smith, 1991, 1993;

Cant és Benson, 2003). A stria acustica intermedia döntően az octopus-sejtek axonjaiból áll, és az ellenoldali lemniscus lateralis magvakhoz, valamint az oliva superiorhoz projiciál (Schofield és Cant, 1997; Cant és Benson, 2003). A stria acustica dorsalisán keresztül a DCN projekciós neuronjai (azaz a piramis- és az óriássejtek) küldik axonjaikat a hallópálya más magvaihoz. A piramis-sejtek döntően a contralateralis colliculus inferiorhoz és corpus geniculatum medialehez projiciálnak; bár írtak le azonos oldali colliculus inferiorhoz tartó axonokat is (Ryugo és Willard, 1985; Cant és Benson, 2003). Az óriássejtek döntően ugyancsak az ellenoldali colliculus inferiorhoz projiciálnak, bár egyes óriássejtek axonjai az ipsilateralis colliculus inferiort és a contralateralis nucleus cochlearist is eléri (Ryugo és Willard, 1985; Cant és Benson, 2003).

A somatosensoros és acusticus információ integrálása a nucleus cochlearis dorsalisban

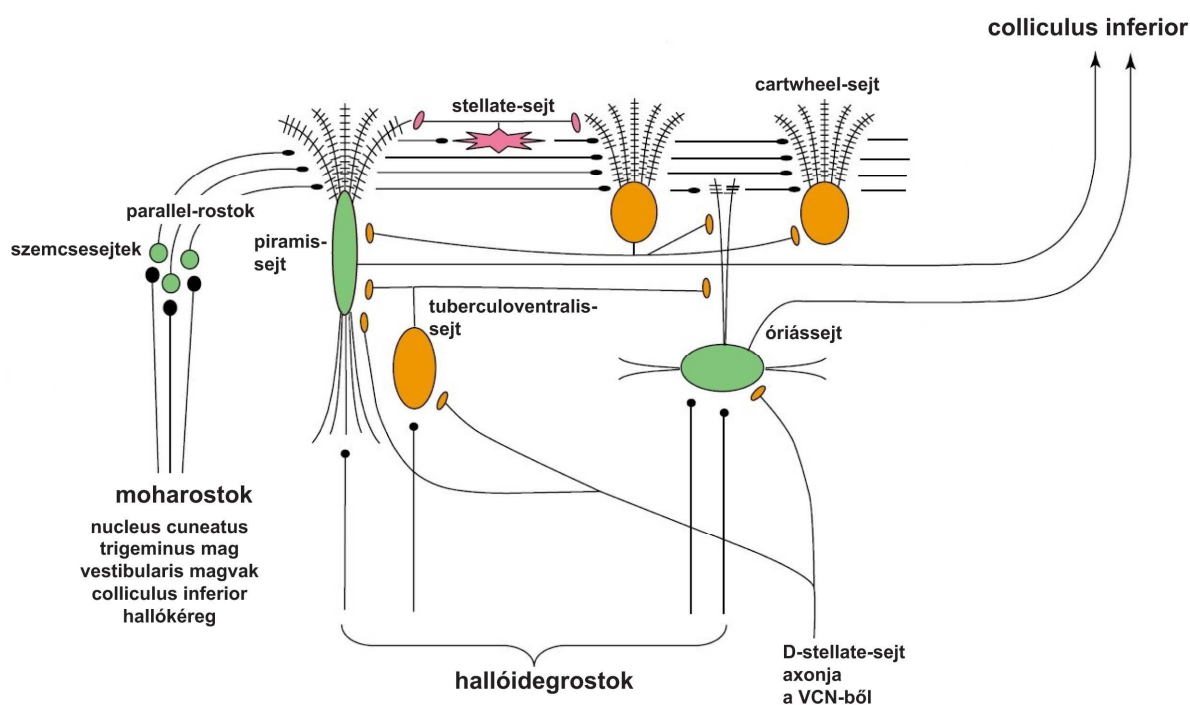
A disszertáció a DCN két sejttypusáról szolgáltat új ismereteket, ezért a jelen alfejezet ezen struktúrát kívánja részletesebben bemutatni. Bár sok információ áll rendelkezésre a DCN egyes sejttypusainak morfológiájáról, kapcsolatrendszeréről és funkcionális sajátosságairól, a DCN egészének funkciója a mai napig nem pontosan tisztázott.

A DCN egy evolúciósan változó fejlettséget mutató struktúra. Főemlősökben és emberben kevésbé fejlett, és ezzel együtt kevésbé rendezett sejtszerkezetet mutat, mint a törzsfajlás alacsonyabb szintjén álló emlősökben. A törzsfajlás magasabb szintjein a szemcsesejtek elhelyezkedése és mennyisége, továbbá egyes majomfajok esetében még a piramis-sejtek elhelyezkedése is eltér a többi emlősben tapasztalhatótól (Moore, 1980; Rubio és mtsai., 2008). Bár a DCN sejtszerkezetét és funkcióját macskában vizsgálták legrészletesebben, több tanulmány is foglalkozik a rágcsálók azonos struktúrájával. A nem-főemlős fajok között a DCN szerkezetében és szerveződésében esetlegesen tapasztalható eltérés nem számottevő (pl. Mugnaini és mtsai., 1980 A; Browner és Baruch, 1982).

A DCN mind coronalis, mind sagittalis metszetekben réteges szerkezetet mutat. Habár különböző szerzők eltérő fajokban végzett vizsgálataik alapján eltérő számú (3–5; Hackney és mtsai., 1990; Mugnaini és mtsai., 1980 A) és nomenklatúrájú réteget írnak le, a legtöbb tanulmány három réteget különböztet meg (Osen, 1969; Brawer és mtsai., 1974). A legfelszínesebben elhelyezkedő *molekuláris réteg*ben a szemcsesejtek axonjai által létrehozott parallel-rostok, a piramis-sejtek apicalis dendritjei, néhány szemcsesejt teste és a Purkinje-szerű sejtek (PLC-k) találhatók. A molekuláris réteg alatt a *piramis-sejtes réteg* húzódik, amiben a piramis-neuronok sejtteste, a legtöbb szemcsesejt szómája, valamint a cartwheel- és

a Golgi-sejtek szómái találhatóak. A DCN *mély rétege* tartalmazza a legtöbb óriásneuron sejttestét és a piramis-sejtek basalis dendritfáját.

A DCN fő projekciós neuronjai, azaz a piramis- és az óriássejtek elkülönítését sok esetben nehezíti, hogy mindkét sejtípus hasonló projekciós területtel, bemenetekkel és tüzelési mintázattal jellemezhető. A helyzetet tovább bonyolítja, hogy sok szerző még a funkcionális elkülöníthetőségüket is vitatja, így ezen alfejezetben is együtt kezeljük őket. A piramis- és óriássejteket elérő serkentő bemenetek két fő csoportra oszthatóak; a basalis dendriteken döntően az acusticus rostok szinaptizálnak, míg az apicalis nyúlványokon a szemcsesejtek axonjai által alkotott parallel-rostok végződnek (5. ábra).



5. ábra. A **nucleus cochlearis dorsalis neuronhálózata**. A nucleus cochlearis dorsalis neuronhálózatának egyszerűsített, sematikus rajza (Oertel és Young, 2004 alapján). A zöld szín a glutamaterg, a narancssárga a glicinerg, a piros pedig a GABAerg sejtek szómáját jelöli. A fekete preszinaptikus terminálisok glutamatergek, a pirosak GABAergek, a narancssárgák glicinergek. A DCN különböző forrásból származó glutamaterg bemeneteit és kimenetei ugyancsak láthatóak.

A dendritikus tüskéktől mentes basalis dendriteken végződő, hallási információt közvetítő acusticus rostok által képzett szinapszisok működésében nem tapasztaltak számottevő szinaptikus plaszticitást (Fujino és Oertel 2003; Oertel és Young 2004). Az apicalis nyúlványok dendritikus tüskéin végződő parallel-rostok döntően a fülkagylók és a fej-nyak helyzetéről közvetítenek somatosensoros és vestibularis információt (Weinberg és Rustioni 1987; Burian és Gstoettner 1988). Ezen szinapszisok működése igen képlékeny,

azokban nagyfokú, kétirányú plaszticitást (hosszú távú potenciáció és depresszió) mutattak ki (Fujino és Oertel 2003; Oertel és Young 2004).

A szemcsesejtek több forrásból érkező információ integrálására képesek. Egyik legfontosabb bemenetüket somatosensoros információ formájában a nucleus cuneatusból kapják (Zhan és mtsai., 2006; Ryugo és mtsai., 2003). Kísérletes tapasztalatok szerint a macska DCN-ről elvezethető legnagyobb amplitúdójú kiváltott potenciált a második nyaki gerincvelői szelvényhez tartozó gerincvelői ideg elektromos stimulációja váltja ki. Ez a gerincvelői ideg, többek között, a fülkagyló mozgását végző izmok propioceptív idege. Miközben a fül mozgását végző izmok megnyújtása a DCN projekciós neuronok AP-tüzelési frekvenciáját jelentősen befolyásolja, a fülkagyló bőrének és szőrének ingerlése nincs hatással ezen sejtek aktivitására (Kanold és Young, 2001). Ezek a kísérleti adatok arra engednek következtetni, hogy a fülkagylók helyzetének beállításáért felelős izmok és a DCN projekciós neuronjai között szoros együttműködés van; azaz a kérdéses neuronok aktivitását a hangingerkek mellett a fül térben elfoglalt helyzete is befolyásolja. Könnyen belátható, hogy ez a mechanizmus a hangforrás térbeli helyzetének meghatározásában lehet kiemelkedő jelentőségű. A szemcsesejtek egyébként a hallópálya magasabban elhelyezkedő struktúráitól is kapnak bemenetet, egyebek között a colliculus inferiortól (Caceido és Herbert, 1993) és a hallókéregtől (Weedman és Ryugo 1996, Schofield és Coomes 2005).

A DCN projekciós neuronjainak működését természetesen gátló hatású bemenetek is befolyásolják. A DCN gátló hatású interneuronjai közül kiemelhetők a cartwheel-sejtek, amik a szemcsesejtektől kapnak serkentő bemeneteket. A cartwheel-sejtek axonjai a piramis- és az óriássejtekkel létesítenek szinaptikus kapcsolatokat. A DCN projekciós neuronjain végződő másik fontos gátló sejtípus a tuberculoventralis-sejt. Ezen sejtfeleség jellegzetessége, hogy egy szűk hangfrekvencia-tartományra érzékenyek, és ilyen frekvenciájú hang jelenlétében jelentős aktivitásfokozódást mutatnak (ún. II-es típusú tüzelési mintázat; Spirou és mtsai., 1999; Rhode, 1999). Gátlóneuronok révén, a tuberculoventralis-sejtek aktivitása gátolja a projekciós neuronok tüzelését (Voigt és Young, 1990).

A projekciós neuronokra jellegzetes tüzelési mintázat az ún. IV-es típusú aktivitás (Young és Brownell, 1976; Rhode és mtsai., 1983; Rhode és Smith, 1986; Spirou és Young, 1991; Joris, 1998). Ennek lényege, hogy egy megfelelő és kellően keskeny sávba eső frekvenciájú hanginger hatására a vizsgált neuronok tüzelési aktivitása csökken, ami valószínűleg a tuberculoventralis-sejtek gátló hatásának eredménye. Ugyancsak AP-frekvencia-csökkenést lehetett megfigyelni akkor is, amikor ugyan széles frekvenciaspektrumú hanginger alkalmaztak, de a specifikus keskeny

frekvenciatartományban a hangerő jelentősen kisebb volt („foghíjas hangspektrum”). Az ilyen és ehhez hasonló kísérleti eredmények arra engednek következtetni, hogy a DCN projekciós neuronjainak aktivitását különösen hatékonyan befolyásolja a „foghíjas spektrumú” hangingerék jelenléte. Fontos megjegyezni, hogy széles- és folyamatos-spektrumú hangingerből a fülkagyló foghíjas hangspektrumot alakít ki, ami a pinna árnyékoló hatásának tudható be. A spektrumban kialakuló hiány a hangforrás és a pinna egymáshoz képest elfoglalt helyzetének megfelelően változik, így ezen spektrális kiesés (ún. „spektrális kulcs”) frekvenciája a hangforrás függőleges és vízszintes síkú pozíciójától és annak esetleges elmozdulásától függ (Musicant és mtsai., 1990; Rice és mtsai., 1992; Xu és Middlebrooks, 2000).

A fentiek alapján úgy tűnik, hogy a DCN projekciós neuronjai olyan bemenetekkel rendelkeznek, amelyek több modalitáson keresztül is információt közvetíthetnek a hangforrás térbeli helyzetéről. A ma legszélesebb körben elfogadott elmélet szerint a DCN egyik lehetséges funkciója a spektrális kulcsok és a somatosensoros bemenetek alapján végzett hangforrás-lokalizáció (Oertel és Young, 2004). Ezen feltételezett funkció jelentőségét kiemeli, hogy a mechanizmus információt szolgáltat a hangforrás verticalis síkban elfoglalt helyzetéről, amire a jóval precízebb – binauralis bemeneteket felhasználó – lokalizációs mechanizmus nem alkalmas.

A DCN-t lehetséges funkciói, sejtszerkezete és bemenetei alapján a kisaggyal és más „kisagyszerű” képletekkel rokon struktúrának tartják. A kisagy jól ismert, mozgási funkcióban betöltött szerepe a sensoros események előrelátásán keresztül valósul meg (Nixon, 2003; Bell és mtsai., 2008). Hasonló funkciót láthatunk egyes elektromos halak (*mormyridae*) elektroszenzoros lebenye esetében (Bell és mtsai., 1993; Bell és mtsai., 1997). A kisagy és a kisagyszerű struktúrák közös sajátossága, hogy multi-modális sensoros vagy sensorimotoros integrációt valósítanak meg. Mindkét esetben egy szemcsesejt–parallel-rost rendszer közvetíti az output neuronok felé a többféle sensoros vagy motoros információt. Ez az információáttevődés olyan szinapszisokon keresztül valósul meg, amik jelentős mértékű plaszticitást mutatnak (Oertel és Young, 2004). A fenti struktúrák további jellegzetessége, hogy a jelentős konvergenciát és plaszticitást mutató parallel-rostos bemeneten kívül egy másik, jelentős szinaptikus plaszticitást nem mutató bemenettel is rendelkeznek (Oertel és Young, 2004).

A Purkinje-szerű sejtek

Léteznek olyan teóriák, amik párhuzamot vonnak a cerebellum és a DCN szerkezete és működésük egyes alapelemei közé (pl. Oertel és Young, 2004). Bár a hasonlóság egyes pontokon nehezen lenne vitatható, a két struktúra természetesen számos lényeges pontban jelentősen különbözik egymástól. A kisagykéreg projekciós neuronjai a GABAerg Purkinje-sejtek, míg a DCN projekciós neuronjai a glutamaterg piramis- és óriássejtek – bár léteznek feltételezések a contralateralis DCN-be projiciáló, glicinergnek gondolt óriássejtek jelenlétéről is (Alibardi, 2003). A DCN neuronhálózatában elfoglalt helyük alapján a cartwheel-sejtek tűnnek a kisgyi Purkinje-sejtekkel analóg struktúrának (Oertel és Young 2004); de ezek inter-, nem pedig projekciós neuronok. Egy érdekes teória szerint, bár a cartwheel-sejtek tartalmazzák a GABA bioszintéziséhez elengedhetetlen glutamát-dekarboxilázt, azok mégis glicinerg neuronok lennének. A feltételezés onnan eredeztethető, hogy a piramis-sejtekről elvezetett, valószínűsíthetően cartwheel-sejtektől származó, gátló posztzinaptikus áramok sztrichnin alkalmazásával kivédhetők voltak (Golding és Oertel, 1997). A kisgyi analógia talaján maradva, a DCN projekciós neuronjai a mély kisgyi magvak sejtjeinek felelnének meg.

A Purkinje-szerű sejtek a DCN egy olyan sejttypusát alkotják, amik morfológiájuk alapján lényegesen nagyobb hasonlóságot mutatnak a cerebellaris Purkinje-sejtekkel, mint a cartwheel-sejtek. A PLC-k, hasonlóan a cerebellaris Purkinje-sejtekhez, igen intenzív calbindin-specifikus immunpozitivitást mutatnak (Hurd és Feldman, 1994; Spatz, 1997; Spatz, 2003; Pór és mtsai., 2005). Legnagyobb számban közvetlenül a DCN subependimális felszíne alatt fordulnak elő, de néhány PLC-t a DCN mélyebb rétegeiben és a VCN-ben is megfigyeltek már (Hurd és Feldman, 1994). A PLC-k sejtteste általában gömbölyű vagy enyhén tojásdad, és mintegy 20–30 μm átmérőjű. Dendritikus nyúlványrendszerük a kisgyi Purkinje-sejtekhez hasonlóan dús elágazódást mutat, de azokkal ellentétben a mag belseje felé, centripetálisan terjed ki. Valószínűsíthető, hogy a PLC-k axonjai – vagy azok kollaterálisai – elhagyják a DCN-t (Spatz, 2003; Pocsai és mtsai., 2007). A PLC-k elektrofiziológiai és membránsajátságait, szinaptikus bemeneteit, lehetséges neurotransmitterét és cerebellin expresszióját ezidáig nem vizsgálták.

Kolinerg moduláció a nucleus cochlearisban

Több adat szól amellett, hogy a CN működését érdemi módon befolyásolják egyes kolinerg mechanizmusok. Immunhisztokémiai kísérletekben muszkarinos kolinergreceptorok és vezikuláris acetilkolin-transzporter jelenlétét és megoszlását egyaránt leírták (Yao és

Godfrey, 1995; Yao és Godfrey, 1999 A). Neuronális jelölőanyagok alkalmazásával azt is igazolták, hogy számos agyi területől érkeznek kolinerg rostok a nucleus cochlearisba; egyebek között az oliva superiorból, a nucleus pedunculopontinus tegmentalisból és a nucleus laterodorsalis tegmentalisból (Sherriff és Henderson, 1994; Mellott és mtsai., 2011). *In vitro* és *in vivo* kísérletek tanúsága szerint kolinerg agonista alkalmazására a DCN spontán aktivitást mutató neuronjainak kb. 90%-a aktivitásváltozással reagál (Chen és mtsai., 1994; Zhang és Kaltenbach 2000).

A fenti, általánosnak mondható megfigyelések mellett léteznek adatok a kolinerg modulációs mechanizmusok sejttípusfüggő hatásaira vonatkozóan is. Egy korábbi tanulmányban munkacsoportunk teljes-sejtes konfigurációjú patch-clamp kísérletekben mutatta ki a DCN óriássejtek kolinerg modulálhatóságát. Beszámoltunk arról, hogy az óriássejtek dendritjei és az azokat elérő parallel-rostok közötti szinapszisokban a neurotranszmisszió preszinaptikusan elhelyezkedő M3-típusú muszkarinos receptorokon keresztül modulálható (Pál és mtsai., 2009). Ez a megfigyelés jól egybeesik azon adatokkal, miszerint a CN szemcsesejteket tartalmazó területein nagy számban fordulnak elő kolinerg idegvégződések (McDonald és Rasmussen 1971; Ryugo és mtsai., 2003). Korábbi eredményeink felvetették továbbá annak lehetőségét, hogy a szemcsesejtek is alanyai lehetnek egyes kolinerg modulációs mechanizmusoknak. A teória megerősítését vagy elvetését célzó specifikus kísérletekre azonban ezidáig nem került sor.

Célkitűzések

A nucleus cochlearis dorsalis egy evolúciósan változó fejlettséget mutató, sok idegsejttípust tartalmazó, hallási és somatosensoros információt integráló struktúra. Funkciója nem minden részletében tisztázott, de egyebek között részt vesz a hangforrás lokalizációjának meghatározásában. Jelen PhD munkában a nucleus cochlearis dorsalis két sejttípusát, a Purkinje-szerű neuronokat és a szemcsesejteket vizsgáltuk. Vizsgálataink célja az volt, hogy új adatokkal járuljunk hozzá a mag és a benne található neuronhálózat funkciójának és szerveződésének pontosabb megértéséhez.

A Purkinje-szerű sejt egy ritka és keveset vizsgált sejttípus, amivel kapcsolatban funkcionális adatok eddig egyáltalán nem álltak rendelkezésre. Ezért jelen munkában célul tűztük ki:

1. A Purkinje-szerű sejtek morfológiájának részletes vizsgálatát, azok egyértelmű azonosításának elősegítése végett.
2. A Purkinje-szerű sejtek által használt neurotranszmitter meghatározását, annak érdekében, hogy megítélhető legyen azok gátló vagy serkentő jellege.
3. A Purkinje-szerű sejtek membránsajátságainak és tüzelési mintázatának vizsgálatát.
4. A Purkinje-szerű sejtek szinaptikus bemeneteinek funkcionális vizsgálatát, annak reményében, hogy kiderítsük, vajon részét képezik-e ezek a sejtek a nucleus cochlearis dorsalis neuronhálózatának.
5. A Purkinje-szerű sejtek cerebellinexpressziós-mintázatának vizsgálatát, és annak összehasonlítását a kisagy Purkinje-sejtekével, annak reményében, hogy megállapítsuk, hogy a két sejtféleség közötti morfológiai hasonlóság vajon erre a sajátosságra is kiterjed-e.

A szemcsesejtek a DCN legkisebb méretű, ugyanakkor legnagyobb számban előforduló sejtjei, melyek fontos szerepet töltenek be a multimodális sensoros integrációban és a projekciós neuronok tüzelési mintázatának kialakításában. Ismert volt, hogy kolinerg agonisták alkalmazása a mag más sejtjeinek (pl. piramis- és cartwheel-neuronok) aktivitását megváltoztatja; továbbá leírták kolinerg terminálisok jelenlétét a nucleus cochlearis szemcsesejteket nagy sűrűségben tartalmazó területein. Mindezen adatok ellenére a szemcsesejtek kolinerg modulálhatóságának vizsgálatára ezidáig nem került sor. Mivel a

kolinerg moduláció a nucleus cochlearis dorsalisban jelerősítő hatással rendelkezik; továbbá léteznek feltételezések, miszerint a kolinerg modulációs mechanizmusok túlfokozott működése fülzúgáshoz vezethet (Chang és mtsai., 2002; Jin és mtsai., 2006; Kaltenbach és Zhang, 2007), a szemcses sejtek kolinerg befolyásolhatóságára vonatkozó új ismereteknek fontos gyakorlati jelentősége is lehet. Ezért a munka második részében az alábbi két jelenségre összpontosítottunk:

1. A nucleus cochlearis dorsalis szemcses sejtek kolinerg modulálhatóságának vizsgálata, funkcionális és immunhisztokémiai módszerek alkalmazásával. A kolinerg hatás meglétét és jellemzőit agyszeletekben történő kalciumkoncentráció-méréssel vizsgáltuk, mert ez a technika módot ad sok sejt aktivitásának egyidejű nyomon követésére.
2. A kolinerg hatásért felelős receptor(ok) azonosítása, részben receptortípus-specifikus immunhisztokémia, részben altípus-szelektív antagonisták alkalmazásával.

Anyagok és módszerek

Kísérleti állatok

Az elektrofiziológiai kísérleteket és az intracelluláris kalciumkoncentráció-méréseket 8–14 napos, az immunhisztokémiai jelöléseket pedig 15 napos és 1–3 hónapos (felnőtt), vegyes nemű Wistar-patkányokon végeztük. Az alkalmazott kísérleti eljárásokat a Debreceni Egyetem Állatkísérletes Bizottsága és az „Animal Care and Ethics Committee of the University of The New South Wales” jóváhagyta. A kísérletek kivitelezése teljes mértékben megfelelt a vonatkozó specifikus magyar, ausztrál és nemzetközi jogszabályoknak. Az állatok tenyésztése a Debreceni Egyetem Élettani Intézetének kísérletes állatházában, természetes nap-éj ciklus mellett történt. Élelem és víz *ad libitum* rendelkezésre állt. A kísérletek elvégzése során a patkányok a lehetséges legkisebb stressznek és fájdalomnak lettek kitéve.

Vegyszerek és oldatok

A funkcionális mérésekhez a következő összetételű művi cerebrospinalis folyadékot (aCSF) alkalmaztuk (mmol/l): 125 NaCl; 2,5 KCl; 26 NaHCO₃; 10 glükóz; 1,25 NaH₂PO₄; 2 CaCl₂; 1 MgCl₂; 3 mio-inozitol; 0,5 aszkorbinsav; 2 nátrium-piruvát. A túlélő agyszeletek preparálására ugyanennek az oldatnak egy módosított, csökkentett nátriumkoncentrációjú változata (LaCSF) szolgált (mmol/l): 250 szaharóz; 2,5 KCl; 26 NaHCO₃; 10 glükóz; 1,25 NaH₂PO₄; 1 CaCl₂; 2 MgCl₂; 0,5 aszkorbinsav.

A funkcionális mérések során bizonyos esetekben az aCSF-et a glutamaterg, glicinerg és GABAerg neurotranszmissziót gátló extracelluláris oldattal egészítettük ki (3G-koktél). A glutamaterg ingerületáttevődést 10 µmol/l 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-szulfamoil-benzo[f]quinoxalin-2,3-dionnal (NBQX) és 50 µmol/l D-2-amino-5-foszfopentanoáttal (D-AP5); a glicinerg neurotranszmissziót 1 µmol/l sztrichninnel, a GABAerg szinapszisokat pedig 10 µmol/l bikukullinnal gátoltuk.

A Purkinje-szerű sejtek elektrofiziológiai vizsgálatához használt, a patch-clamp pipettában levő oldat összetétele a következő volt (mmol/l): 118 K-glükonát; 4 KCl; 10 HEPES; 4 K₂-ATP; 0,3 Na₃-GTP; 10 Na₂-foszfokreatin; kb. 8 biocitin.

A kalciumkoncentráció-mérések az Oregon Green 488 BAPTA-1 fluoreszcens kalciumindikátor-festék (OGB) acetoxi-metilészter (AM) formájának (Invitrogen-Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) alkalmazásával történtek. A festék 50 µg-nyi mennyiségének 40 µl DMSO-ban történő feloldásával 1 mmol/l koncentrációjú törzsoldatot készítettünk. A

törzsoldatot -20 °C-on, 4 µl-es porciók formájában tároltuk. A törzsoldat készítéséhez használt DMSO-t 0,5% pluronsavval és 0,1% Cremophor EL-lel egészítettük ki.

Az immunhisztokémiai jelölésekhez szokásos összetételű foszfátpuffert (PB), valamint foszfát- (PBS) és tris-pufferelt sóoldatot (TBS) alkalmaztunk (pH = 7,4). A fixáláshoz 4%-os paraformaldehid oldatot (PFA) használtunk.

Túlélő agyszeletek preparálása

Az patkány dekapitációja után az agyat kipreparáltuk, majd túlhűtött LaCSF-ba helyeztük. Az agyat a median-sagittalis sík mentén félbevágtuk, majd a nagy- és kisagyféltekéket eltávolítottuk. Az agytörzs így előkészített két felét cianoakrilát tartalmú pillanatragasztóval egy vibratóm fémtökéjéhez rögzítettük (Microm HM 650 V, Microm International GmbH, Walldorf, Németország), és 200 µm vastag sagittalis szeleteket készítettünk. Az elkészült DCN szeleteket művi cerebrospinalis folyadékkal feltöltött inkubációs kamrában, fél órán át, 37 °C-on inkubáltuk, majd szobahőmérsékletre hűtöttük. Az inkubációs oldatot karbogénnel (95% O₂ és 5% CO₂ keveréke) buborékolattuk, így biztosítva a médium megfelelő oxigéntartalmát és pH-ját.

Teljes-sejtes konfigurációjú patch-clamp mérések – elektrofiziológia és biocitines jelölés

Az elektrofiziológiai mérések előtt és közben a neuronokat egy 63× nagyítású, vízimmerziós objektívvel és Nomarski-optikával felszerelt Zeiss Axioskop mikroszkóp (Zeiss, Oberkochen, Németország) segítségével választottuk ki és figyeltük meg. A mérés során a szeleteket karbogénnel buborékolatott művi cerebrospinalis folyadékkal perfundáltuk (kb. 1 ml/perc). A mikroelektrodákat boroszilikát üvegkapillárisból (GC150TF-10, Harvard Apparatus Ltd, Holliston, MA, USA), vertikális húzóval készítettük (Narishige, Tokió, Japán). A pipettaoldattal töltött mikropipetták ellenállása 2–2,5 MΩ volt. Méréseinkhez Axopatch 200A erősítőt alkalmaztunk (Molecular Devices, Union City, CA, USA). Az adatok rögzítése 10 kHz-es mintavételi frekvenciával, a Clampex 6.0 és Fetchex 6.0 programok alkalmazásával történt. A kísérletes adatok kiértékelését a Clampfit 9.0 és a MiniAnalysis (Synaptosoft, Decatur, GA, USA) programokkal végeztük.

A neuronokat a mérések közben biocitinnel töltöttük fel. A mérést és a biocitines töltést követően a szeleteket egy éjszakán át fixáltuk (4%-os PFA, 4 °C). Az így fixált szeleteket 0,1% Triton X-100-at és 10% borjúsérumot tartalmazó PBS-ben, egy órán át permeabilizáltuk. A permeabilizálás után a szeleteket mostuk (3 × 10 perc; PBS), láthatóvá

tettük a biocitint [streptavidinhez kötött Alexa488 (1:300); 90 perc], majd ismét mostuk (3×10 perc; PBS). A permeabilizálási, mosási és előhívási lépéseket szobahőn, lassú rázatás mellett végeztük. A szeleteket tárgylemezre szélesztettük, majd Vectashield fedőmédiummal és 0,15 mm vastag fedőlemezzel lefedtük azokat.

„Loose-patch” mérések

Egyes esetekben, az intracelluláris kalciumkoncentráció mérésével párhuzamosan, a neuronok akcióspotenciál-tüzelési mintázatát is vizsgáltuk, amihez a „loose-patch” technikát alkalmaztuk. Ezekben a kísérletekben a 3–4 M Ω ellenállású mikroelektrodákat művi cerebrospinalis folyadékkal töltöttük fel. A mérések közben a mikroelektroda hegyét a sejthártyához nyomtuk, de az üvegapilláris vége és a sejtfelszíni membrán között nem hoztunk létre nagy ellenállású kapcsolatot („gigaseal”). Az így kialakított mikroelektroda-sejthártya kapcsolat ellenállása ugyan legalább 40 M Ω volt, de az soha nem közelítette meg a teljes-sejtes konfigurációban szokásosan elért G Ω nagyságrendet. A sejtek elektromos aktivitását egy Axopatch 200A erősítő közbeiktatásával, feszültség-clamp üzemmódban, a Clampex 10.2 program folyamatos mintavételezést biztosító („gap-free”) protokolljával követtük nyomon és rögzítettük. A mintavételi frekvencia 10 kHz volt. A regisztrátumok zajszűrését és elemzését a Clampfit 10.2 programmal végeztük.

Az intracelluláris kalciumkoncentráció mérése

Az intracelluláris kalciumkoncentráció változásainak mérését képalkotó technika („calcium imaging”) alkalmazásával vizsgáltuk. A kísérletek első lépésében a túlélő agyszeletekben elhelyezkedő neuronokat egy fluoreszcens, kalciumkoncentráció-függő emissziót mutató festék (Oregon Green 488 BAPTA-1) acetoxi-metilészter formájával (OGB-AM) töltöttük fel. Ennek érdekében a túlélő agyszeleteket egy művi cerebrospinalis folyadékot tartalmazó és Millicell CM sejtenyésző-edénybe illeszthető kamrácskába helyeztük (Millipore, Billerica, MA, USA), majd a szeletet körülvevő oldatot 120 μ l mennyiségű, 33 μ mol/l koncentrációjú OGB-AM oldatra cseréltük. Az agyszeletet és az Ca^{2+} -érzékeny festéket tartalmazó kamrácskát egy 24 lyukú sejtenyésző edény előzetesen 450 μ l művi cerebrospinalis folyadékkal feltöltött üregébe helyeztük. A sejtenyésző edényt 20–25 percre sejtenyésző inkubátorba helyeztük (37 °C, 5% CO_2). Az inkubálási periódus alatt a sejtek felvették az acetoxi-metilészter-csoporttal membránpermeábilissá tett Ca^{2+} -érzékeny festéket. A cytoplasmába jutott festékmolekulákról a sejt aspecifikus észterázai eltávolították az AM-csoportokat, így a festék polárisává vált és felhalmozódott a sejtben belül. A sejtek által

fel nem vett festék eltávolítása végett, az inkubálási periódus leteltével a szeleteket újra a szokásos összetételű művi cerebrospinalis folyadékba helyeztük (15–20 perc).

A Ca^{2+} -érzékeny festékkel töltött sejteket tartalmazó szeleteket egy Zeiss Axioskop mikroszkóp 20× és 63× nagyítású, vízimmerziós objektívei segítségével vizsgáltuk. A kísérletek során a szeleteket karbogénnel buborékoltatott művi cerebrospinalis folyadékkal perfundáltuk (1 ml/perc).

A vizsgálatokhoz alkalmazott mikroszkóp egy olyan képalkotó rendszerrel volt felszerelve, ami lehetővé tette fluoreszcens jelek detektálását és a fluoreszcenciaintenzitás időbeli változásainak a rögzítését (Till Photonics GmbH, Gräfelfing, Németország). A fluoreszcens jelek detektálását egy CCD kamera (SensiCam, PCO AG, Kelheim, Németország), a megfelelő hullámhosszúságú fény kibocsátását pedig egy xenon izzót tartalmazó fényforrás (Polychrom V, Till Photonics) végezte. A fluoreszcens festék gerjesztése 488 nm hullámhosszúságú fénnel történt. A fluoreszcens jel elkülönítését és láthatóvá tételét Omega 505DRLPXR dikroikus tükör (Omega Optical Inc., Brattleboro, VT, USA) és egy olyan LP 515 típusú felüáteresztő emissziós szűrő biztosította, melynek vágási hullámhossza 515 nm volt (Till Photonics). A kalciumkoncentráció-változások rögzítése alatt az 1,4 Megapixeles kamerát 8 × 8-as pixelkapcsolással („binning”) használtuk, ami 172 × 130 pixel felbontású képeket eredményezett. A mintavételi frekvencia 10 Hz volt. Az adatrögzítés kívánt paramétereit a Till Vision szoftver 4.0.1.3-as verziójával állítottuk be.

A vizsgált sejtek morfológiájának pontosabb megítélése végett konfokális mikroszkópos kalciumkoncentráció-mérés is történt (Zeiss LSM Live 7 konfokális mikroszkóp). Ezen kísérletekben a Ca^{2+} -érzékeny festék gerjesztése argon-ion lézerrel, ugyancsak 488 nm hullámhosszúságon történt. A kalciumkoncentráció-változásokat 20× nagyítású objektívvel készült, 512 × 512 pixel felbontású, 10 Hz frekvenciával rögzített képek formájában követtük nyomon. A sejtek morfológiájának pontosabb megítéléséhez 40× nagyítású objektívvel készítettünk rétegfelvétel-sorozatot („Z-stack” képsorozatot). Az egyedi optikai szeletek vastagsága 0,4 μm volt. Egy rétegfelvétel-sorozat általában 70 optikai szeletet tartalmazott.

A kalciumkoncentráció-változások kiértékelése

A fluoreszcens kalciumkoncentráció-mérések eredményét 16 bites TIF képsorozatok formájában exportáltuk a Till Vision programból. A képsorozatok kiértékelése az egyedi sejtek azonosításával és manuális kijelölésével kezdődött („region of interest”; a továbbiakban ROI), amihez az Image J programot alkalmaztuk (National Institutes of Health). A következő

lépésben az Image J program „multi measure” funkciójával számszerűsítettük a ROI-k átlagos fluoreszcenciaintenzitásának időbeli változását. A nyugalmi fluoreszcencia értékének meghatározása mindig egy legalább 25 ciklus hosszú, aktivitásmentes periódus fluoreszcenciaértékeinek átlagolásával történt. A disszertáció megfelelő ábráin bemutatott görbék esetében minden fluoreszcens adatpontot ezen nyugalmi fluoreszcenciaértékhez hasonlítottunk, és azt százalékos formában adtuk meg.

Annak érdekében, hogy a nagy számú ROI-ból származó fluoreszcenciaváltozásokat vizsgálni tudjuk, egy számítógépes programot írtunk. Az analizáló program alkalmas volt zajszűrésre, a Ca^{2+} -tranziensek fél-automatikus felismerésére, és az azokat jellemző kinetikai paraméterek meghatározására. Mivel a program működésének részletes ismertetése meghaladja a jelen PhD disszertáció kereteit, a továbbiakban csak az ezzel kapcsolatos leglényegesebb információkat adjuk meg. A program részletes bemutatása a disszertáció megfelelő részének alapjául szolgáló angol nyelvű dolgozatban megtalálható.

A program az időfüggő fluoreszcens jeleket különböző frekvenciakomponensekre bontotta. A jel-zaj arány növelése, így a kalciumtranziensek helyes felismerésének elősegítése érdekében egy zajszűrt jelet (Fd) képeztünk. A folyamat jelalak-változtató hatásnak jellemzése végett összehasonlítottuk az eredeti és a zajszűrt regisztrátumok Fourier-analízissel előállított frekvenciaspektrumait. Úgy tapasztaltuk, hogy a 0,5 Hz alatti frekvenciakomponensek jórészt megtartottak voltak, ugyanakkor az eljárás az ennél nagyobb frekvenciával jellemezhető jelek 25–75%-át eltüntette. A veszteség mértéke az eredeti jel frekvenciájának növekedésével fokozódott.

A kalciumtranziensek felismerése érdekében kiszámítottuk a zajszűrt jel első deriváltját, és azon adatpontok folyamatos sorát tekintettük jelnek, amik egy előre meghatározott küszöbérték fölé ($0,04 \text{ s}^{-1}$) estek. Minden ilyen adatsor által kijelölt időintervallumot meghosszabbítottunk a zajszűrt görbén található előző minimum- és a következő maximumhelyig, amivel kijelöltük az adott Ca^{2+} -tranziens felszálló szárát. Ezt követően az előző lépésben nyert időintervallumot meghosszabbítottuk a zajszűrt görbe következő minimumhelyéig, aminek eredményeként a kalciumtranziens teljes hosszát definiáltuk.

Az eredeti és a zajszűrt jelek összehasonlításakor látható, hogy a program képtelen volt minden kalciumtranziens felismerésére, ami leginkább a nagy frekvenciájú aktivitásnál jelentett problémát. A nagy frekvenciájú aktivitás gyakran eredményezett részlegesen vagy teljesen összeolvadó, torz kalciumtranzienseket, amiket a program alkalmanként egyetlen különálló Ca^{2+} -tranziensnek minősített. Mivel ezen tranziensek kinetikai paramétereinek pontos megítélése lehetetlen volt, ezeket az eredeti regisztrátummal való összehasonlítás után,

manuális ellenőrzés mellett kihagytuk a későbbi analízisből. Bár az így kivitelezett analízis a neuronok fokozott aktivitásához társuló Ca^{2+} -tranziensek valós frekvenciájának alulbecslését eredményezte, a módszer még ezzel együtt is megbízhatóan jelezte a nyugalmi (kontroll) állapothoz képest bekövetkező aktivitásfokozódást, így alkalmas volt a jelen disszertáció keretein belül kitűzött feladatok elvégzésére.

Immunhisztokémia

Az M1- és M3-típusú muszkarinos kolinergreceptorok immunhisztokémiai jelölését 15 napos és 4 hetes patkányokon végeztük (mindkét korcsoportban $n = 2$). Az állatokat halálos dózisú (240 mg/kg) pentobarbitál-nátriummal túlaltattuk, majd 4%-os paraformaldehiddel transzkardiálisan perfundáltuk őket. Az agyak kipreparálása után utófixáltuk (2 óra; 4 °C), majd krioprotekció céljából 30%-os szacharózoldatba merítettük azokat. Az így előkészített agyakból egy Leica CM 1950 kriosztáttal (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Németország) 40 μm vastagságú coronalis és sagittalis metszeteket készítettünk. M1- és M3-receptor-specifikus immunhisztokémiai jelölést csak a nucleus cochlearist is tartalmazó szeleteken végeztünk. Az alkalmazott elsődleges és másodlagos antitestek részletes bemutatására az 1. táblázat szolgál. A szeleteket 5%-os szérumot tartalmazó oldattal blokkoltuk, amit az elsődleges antitestekkel való inkubálás követett (2 nap; 4 °C). A másodlagos antitestek alkalmazására mosást követően került sor, azokat 2 órán át, szobahőmérsékleten alkalmaztuk. Újabb mosás után a szeleteket DAPI-dilaktátot is tartalmazó fluoreszcens médiummal fedtük le (Dako, Campbellfield, VIC, Australia). Az M1- és M3-specifikus immunfluoreszcens jelölődést konfokális mikroszkóppal, 20 $\times$ és 40 $\times$ nagyítású objektívek alkalmazásával vizsgáltuk (Nikon Eclipse 90i; Nikon, Tokió, Japán). Az egyedi látóterekről készített felvételeket az Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) segítségével, digitálisan egyesítettük.

A Purkinje-szerű sejtek immunhisztokémiai vizsgálata során az agy kipreparálása jéghideg, alacsony Na^{+} -koncentrációjú cerebrospinalis oldatban történt. Eltávolítása után az agyatt 4%-os paraformaldehidben, 4 órán keresztül, 4 °C-on fixáltuk. A fixált szövetet foszfátpufferben mostuk, majd vibratóm segítségével 80 μm vastag a nucleus cochlearist is tartalmazó szeleteket készítettünk (Campden Instruments, Loughborough, UK). A szeleteket mostuk (3 $\times$ 10 perc, szobahő) és permeabilizáltuk (60 perc), amit az elsődleges antitestek alkalmazása követett (2 nap, 4 °C vagy 12 óra, szobahő). Az inkubációs idő letelte után a szeleteket ismét mostuk (3 $\times$ 15 perc), majd a másodlagos antitestek alkalmazására került sor

(24 óra, 4 °C vagy 3 óra, szobahő). Újabb mosást követően (3 × 10 perc) a szeleteket tárgylemezre úsztattuk és fedtük.

1. táblázat
Az immunhisztokémiai kísérletekben alkalmazott elsődleges és másodlagos antitestek

Antitest	Hígítás	A faj, amiben termeltették	Forrás
Anti-calbindin	1:200	Kecske	Santa Cruz ^a
Anti-cerebellin-1	1:500	Nyúl	Lifespan ^b
Anti-GAD65/67	1:4000	Nyúl	Sigma ^c
NeuN	1:500	Egér	Chemicon ^d
Anti-synaptophysin	1:2000	Egér	BioGenex ^e
Nyúl IgG ellenes FITC	1:1000	Kecske	Vector ^f
Kecske IgG ellenes FITC	1:100	Szamár	Santa Cruz
Kecske IgG ellenes FITC	1:1000	Nyúl	Vector
Kecske IgG ellenes Texas Red	1:1000	Nyúl	Vector
Nyúl IgG ellenes Texas Red	1:100	Borjú	Santa Cruz
Egér IgG ellenes Texas Red	1:1000	Egér	Vector ^f
Nyúl IgG ellenes cyanine 3	1:500	Szamár	Jackson ^g
Anti-M1	1:200	Nyúl	Alomone ^h
Anti-M3	1:200	Nyúl	MBL International ⁱ
Nyúl IgG ellenes Alexa488	1:250	Kecske	Invitrogen ^j

^aSanta Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA; ^bLifespan Biosciences Inc., Seattle, WA; ^cSigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO; ^dChemicon International, Inc., Temecula, CA; ^eBioGenex, San Ramon, CA; ^fVector Laboratories, Inc., Burlingame, CA; ^gJackson ImmunoResearch Europe Ltd., Suffolk, UK; ^hAlomone Labs Ltd., Jeruzsálem, Izrael; ⁱMBL International Corporation, Woburn, MA, USA; ^jInvitrogen, Mulgrave, VIC, Ausztrália

A táblázatban világosszürke háttér a Purkinje-szerű sejteket célzó, sötétszürke háttér pedig a kolinerg modulációval összefüggő kísérletekhez alkalmazott antitesteket jelzi.

Statisztikai módszerek

A számszerűsíthető adatokat minden esetben átlag ± S.E.M. formában tüntettük fel. A kalciumtranziensek frekvenciaváltozásainak vizsgálatánál olyan statisztikai próbákat alkalmaztunk, amelyek alkalmasak nem-normális eloszlású adathalmazok összehasonlítására. Azokban az esetekben, amikor ugyanazon populációhoz tartozó átlagokat hasonlítottunk össze, a „Wilcoxon signed rank tesztet”, amikor pedig különböző populációkból származó átlagokat hasonlítottunk össze, a Mann-Whitney tesztet alkalmaztuk.

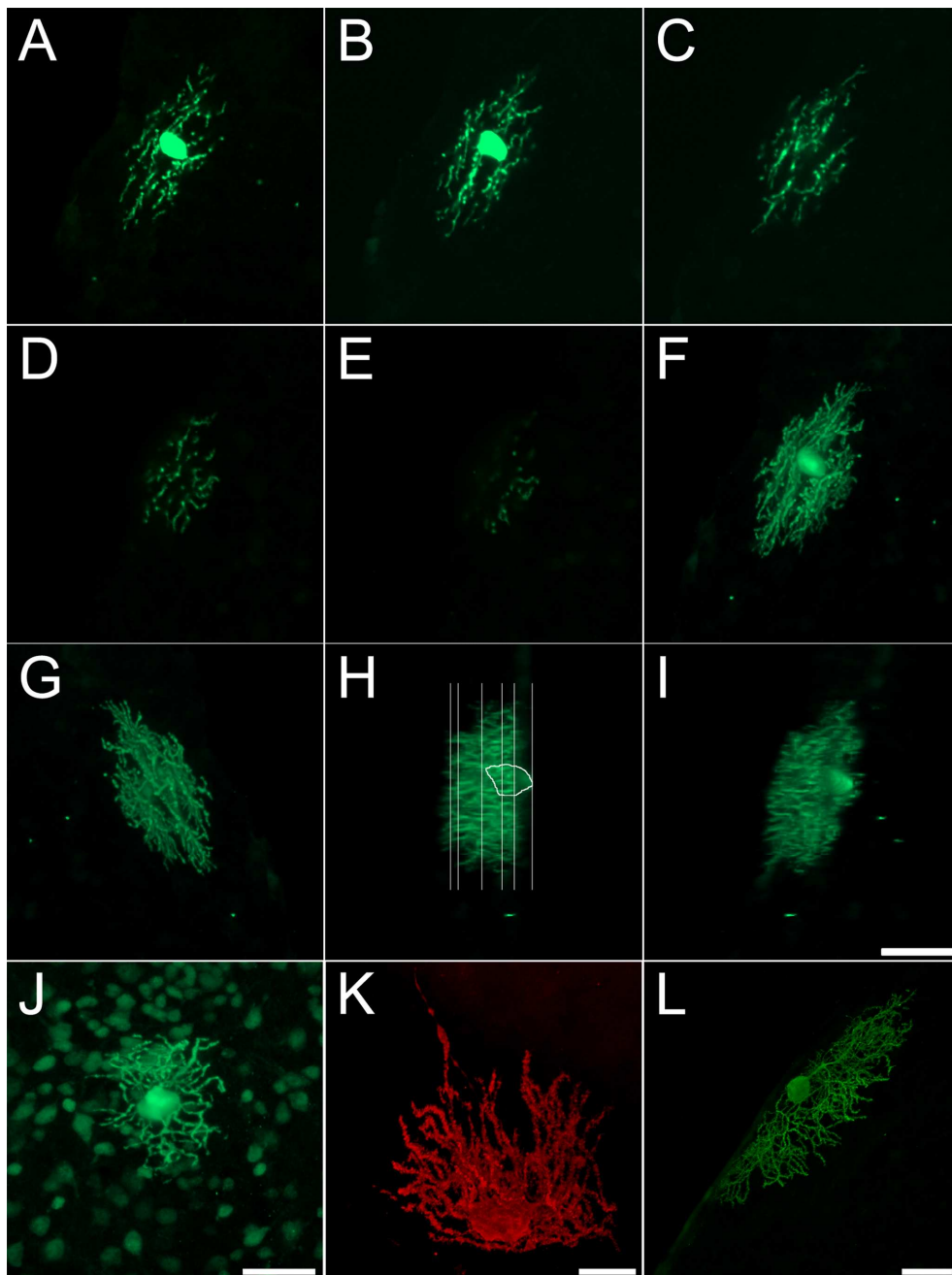
Eredmények

A nucleus cochlearis dorsalis Purkinje-szerű sejtjeinek vizsgálata

A Purkinje-szerű sejtek morfológiai jellemzése

A nucleus cochlearis dorsalis Purkinje-szerű sejtjei jelentős mennyiségben expresszálják a calbindin nevű Ca^{2+} -kötő fehérjét, így ezen sejtek morfológiájának vizsgálatához jelentős segítséget nyújtott a DCN calbindin-specifikus immunhisztokémiai jelölése. A calbindin-specifikus immunhisztokémiát néhány esetben az idegsejtek magjának immunjelölésével kombináltuk (NeuN), hogy az intenzív calbindin-jelölődést mutató sejtek esetleges gliális eredetét kizárhassuk. Az ilyen calbindin/NeuN-specifikus kettős immunjelölést alkalmazó kísérletekben minden Purkinje-szerű sejtnek azonosított struktúra igen erős NeuN-pozitivitást is mutatott, bizonyítva azok neuronális természetét.

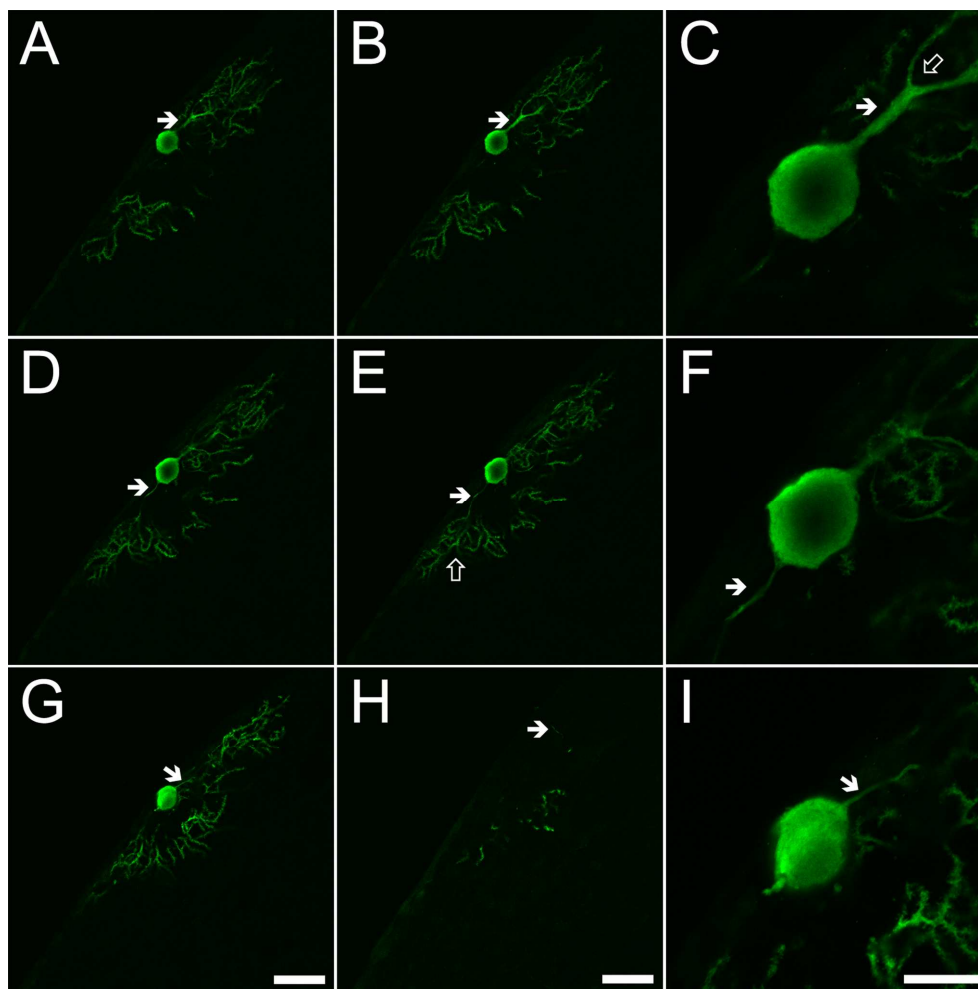
A 6. ábra konfokális mikroszkópos képein a PLC-kre jellegzetes morfológiai sajátosságok figyelhetők meg. Az 1A–E képeken ugyanazon PLC különböző optikai síkokban készített, 1 μm vastag rétegfelvételei láthatók. Az 1F panelen ugyanezen sejtnek a rekonstruált képét tüntettük fel, amit egyebek között az 1A–E részekben bemutatott egyedi felvételekből készítettünk. A teljes rekonstrukció 66 optikai szelet felhasználásával készült. Az 1. ábra G–I részein bemutatott felvételeket úgy kaptuk, hogy ugyanezen PLC rekonstruált képét különböző mértékben és irányban elforgattuk. A 1H felvétel az 1F panel 90°-os elforgatása utáni helyzetet példázza, ahol az 1A–E képeken bemutatott optikai szeletek helyét fehér vonalakkal jelöltük, a sejtestet pedig körülrajzoltuk. Valamennyi vizsgált PLC figyelembe vétele után a sejtestek legnagyobb átmérője a sagittális síkban 28 ± 4 , míg a sagittális síkra merőlegesen 25 ± 2 μm volt ($n = 33$). A PLC-k átlagos szómatérfogata 7200 ± 650 fl volt ($n = 33$), és jelentős variabilitást mutatott (a számított értékek 1976 és 15023 fl között változtak).



6. ábra. A PLC-k megjelenése és morfológiai sokfélesége calbindin-specifikus immunjelölést követően. (A–E) Sagittális síkban készült, 1 μ m vastag, konfokális mikroszkópos rétegfelvételek ugyanazon PLC-ről. Az egyes optikai szeletek a sejt legfelszínesebb pontja által meghatározott síknál 12, 22, 38, 56 és 62 μ m-rel mélyebben húzódnak. (F) Ugyanezen PLC rekonstruált képe, ami valamennyi optikai szelet ($n = 66$) felhasználásával készült. (G) Az (F) panelen látható rekonstruált PLC 174°-os elforgatása után látható kép. (H) Ugyancsak az (F) panelen látható PLC, ezúttal annak 90°-os elforgatása után. A bal oldalon meghúzott fehér vonal annak a legfelszínesebben futó optikai szeletnek a pozícióját jelöli, amiben a sejt először megjelent; az ettől jobbra eső párhuzamos egyenesek az (A–E) paneleken látható optikai szeletek helyét jelölik. A sejtest körvonala ugyancsak jelölve van. (I) Az (F) panelen látható sejt 60°-os elforgatás után nyert kép. (J) Egy, a DCN mély rétegeiben elhelyezkedő PLC rekonstrukciója. A kép 22, egyenként 2 μ m vastag optikai rétegfelvétel felhasználásával készült. (K) A DCN felszínéhez közel elhelyezkedő, centripetális (kolumnáris) dendritfával rendelkező PLC rekonstruált képe. (L) Ugyancsak a DCN felszínéhez közel elhelyezkedő, ám legyezőszerű dendritfával jellemezhető PLC rekonstruált képe. Kalibráció: 50 μ m (A–J és L) és 20 μ m (K).

Dendritfájuk morfológiája alapján a PLC-ket három csoportba oszthattuk. A legkevesebb esetszámmal tartalmazó csoportban ($n=3$) a dendritek sugárszerű lefutást mutattak a tér minden irányába, így a dendritfa egésze gömb alakúnak mutatkozott (6J ábra). Az ezen csoportba tartozó sejtek a DCN mély rétegeiben, míg az összes többi PLC a mag ependymalis felszínéhez közel, igen felületesen helyezkedett el. Ezen felszínesen elhelyezkedő PLC-k egy részénél a proximális nyúlványok többé-kevésbé párhuzamosan, a mag mély rétegei felé haladtak (kolumnáris, centripetális arborizációt mutató PLC-k, 6K ábra). A sejtek fennmaradó része esetében a proximális nyúlványok a mag felszínével párhuzamosan haladtak, és csak a másodlagos nyúlványok irányultak a mag mélyebb rétegei felé, ami miatt a dendritfa kifejezetten legyező alakú volt (6L ábra). A legyezőszerű PLC-k dendritikus arborizációja sagittális síkban igen kiterjedt, míg arra merőlegesen kifejezetten lapos volt. A 6L ábrán látható sejt esetében például a dendritfa legnagyobb kiterjedése a sagittális síkban $308\text{ }\mu\text{m}$, míg a rá merőleges Z-síkban $30\text{ }\mu\text{m}$ volt. Az utóbbi két morfológiai csoportba 15-15 sejt tartozott (45-45%). Ezen csoportok néhány alaktani paraméter tekintetében nagyon hasonlóan mutatkoztak, ideértve a számaátmérőket és -térfogatokat. A legyezőszerű PLC-k sejtestének átlagos mérete $31 \times 27\text{ }\mu\text{m}$, számatérfogata 9300 fl , míg dendritfájuk átlagos kiterjedése a sagittális síkban $7000\text{ }\mu\text{m}^2$ volt. A centripetális arborizációt mutató PLC-k esetében ugyanezen paraméterek $28 \times 27\text{ }\mu\text{m}$, 8100 fl és $8700\text{ }\mu\text{m}^2$ voltak.

A PLC-k nyúlványrendszerének részletes vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a dendritikus tüskéktől mentes eredő dendritek egy része meglepően vastag volt (pl. 7A–C ábra; a kitöltött nyíllal jelölt nyúlvány átmérője $3,2\text{ }\mu\text{m}$), más esetekben jóval vékonyabb eredő dendriteket láttunk (általában $0,7\text{--}1,25\text{ }\mu\text{m}$; 7D–F ábra). A 7F képen nyíllal jelölt nyúlvány proximális része morfológiája és átmérője alapján akár axonként is azonosítható lenne, de a distalis szakasz megjelenése nyilvánvalóvá teszi, hogy ez egy eredő dendrit (7E felvétel; üres nyíl). A megállapítás helyességének igazolására a 7G–I képeken nyíl jelöli ugyanezen sejt axonját. Mind a vastag, mind a vékony eredő dendritekből rendkívül sűrűn elágazódó, dendritikus tüskékkel dúsan borított dendritfák indultak ki.



7. ábra. Egy Purkinje-szerű sejt dendritfájának szerkezete. Minden panel ugyanazon legyezőszerű dendritfát mutató PLC valamelyik részletét mutatja, calbindin-specifikus immunjelölést követően. **(A)** Egy egyedi optikai szelet, ahol a nyíl egy vastag, dendritikus tüskéktől mentes dendritre mutat. **(B)** Ugyanazon dendrit; a felvétel az (A) képen bemutatottól 1 μm -rel felületesebben készült. **(C)** Az (A) és (B) paneleken jelölt dendrit nagy nagyítású képe. A kitöltött nyíl a proximális szakaszt jelöli, az üres nyíl egy elágazódási pontra mutat. **(D–E)** Egyedi rétegfelvételek, amik egy vékony, tüskéktől mentes dendritet ábrázolnak. Az üres nyíl a kitöltött nyíllal jelölt dendrit igen kiterjedt elágazódási rendszerére mutat. **(F)** A (D) és (E) paneleken jelölt dendrit kezdeti szakaszának nagy nagyítású képe. **(G)** A bemutatott PLC axonjának kezdeti szakasza (nyíl). **(H)** Nyíl jelöli az axon sejttestől számított, a teljes felvételsorozat alapján meghatározható legtávolabbi pontját. **(I)** Nagy nagyítású rétegfelvétel; nyíl jelöli az axon proximális szakaszát. A (G) és (H) paneleken a kalibrációs egyenesek 50 μm -t jelölnek, és alkalmazhatóak az (A–B) és (D–E) képekre is. Az (I) panelen látható kalibrációs egyenes 20 μm -t jelöl, és alkalmazandó a (C) és (F) felvételekre is.

A bemutatott felvételek alapján látható, hogy a PLC-k sűrű, dús elágazódást mutató dendritfaja sokszor szinte teljesen elfedi a sejttestet. Ez a morfológiai sajátosság nagyon megnehezítheti az eredő nyúlványok számának meghatározását, különösen ha az klasszikus szövettani módszerek alkalmazásával történik. Ennek a megállapításnak a tükrében nem meglepő, hogy ezidáig nem állt rendelkezésre a PLC-k nyúlványainak számára vonatkozó információ. A proximális nyúlványok számának megítélését az általunk végzett kísérletsorozatban a nyúlványrendszer intenzív jelölődése és a konfokális mikroszkópia

alkalmazása tette egyértelművé. Megállapítottuk, hogy a PLC-k átlagosan 11 ± 1 nyúlvánnyal rendelkeznek ($n = 33$). Az egyes sejtekhez tartozó értékek széles szórást mutattak; az eredő nyúlványok száma 4 és 19 között változott. A PLC-k felszínesen elhelyezkedő morfológiai csoportjaiban hasonló átlagos nyúlványszámot tapasztaltunk. A legyezőszerű PLC-k esetében ez az érték 13 ± 1 ($n = 15$), míg a kolumnáris dendritikus arborizációt mutató PLC-k esetében 10 ± 2 ($n = 15$) volt – mindkét esetben igen jelentős csoporton belüli változékonysággal.

A Purkinje-szerű sejtek membránsajátságai és posztzinaptikus áramai

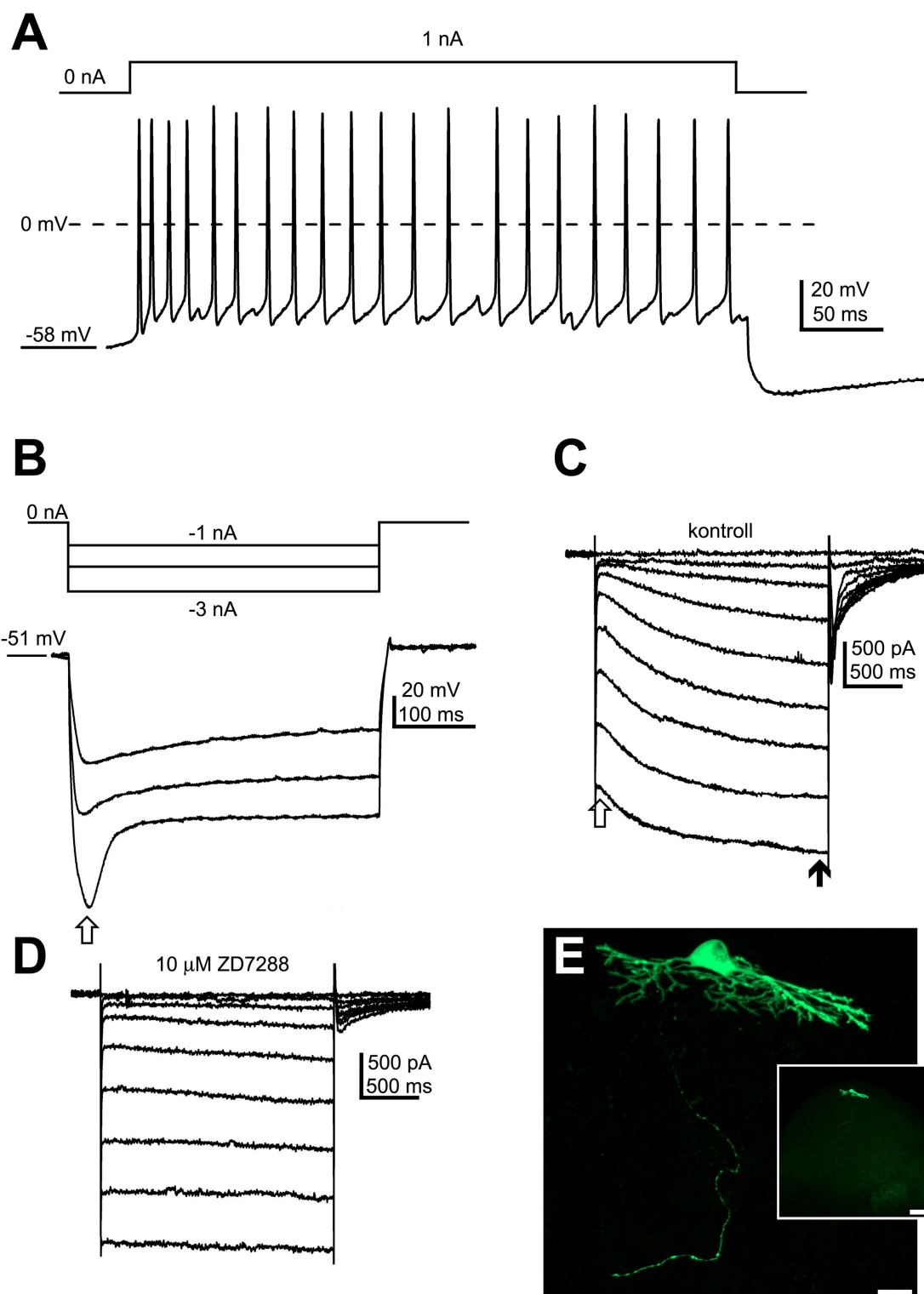
A PLC-k morfológiai jellemzése után egyes funkcionális sajátságai vizsgálatára került sor, aminek érdekében teljes-sejtes konfigurációjú patch-clamp méréseket végeztünk. A kísérletek során a sejteket biocitinnel töltöttük fel, így a funkcionális méréseket követően mód nyílt a morfológiai sajátosságok pontos meghatározására. A patch-clamp mérésekhez a DCN subependymalis felszíne alatt előbukkanó, nagy méretű, közel gömb alakú sejttessel rendelkező sejteket kerestünk. A biocitin láthatóvá tételét követő morfológiai azonosítás során megállapítottuk, hogy az ilyen feltételek mentén kiválasztott 43 sejt közül 12 volt PLC (31%). A célzott, sejtspecifikus keresés ellenére tapasztalható alacsony előfordulási arány jól illusztrálja az ezen sejttípus megbízható azonosításával összefüggő nehézségeket, és annak ritka előfordulását a magon belül.

A PLC-k igen nagy teljes-sejtes kapacitással rendelkeztek (89 ± 5 pF, $n = 12$). A vizsgált 12 sejtből 10 a DCN ependymalis felszínéhez közel, kettő pedig annak mély rétegeiben helyezkedett el. Nem meglepő módon, a hatalmas dendritfával rendelkező sejtek membránpotenciálját nem tudtuk kellő hatékonysággal beállítani és szabályozni, így a voltage-clamp kísérletek során alkalmazott depolarizáló feszültséglépcsők időtartama alatt gyakran regisztráltunk a nyúlványok felől betörő akciós potenciálokat. A membránpotenciál elégtelen szabályozása miatt nem volt lehetőségünk a PLC-k depolarizáció hatására aktiválódó ionáramainak vizsgálatára.

A PLC-k átlagos nyugalmi membránpotenciálja -53 ± 1 mV volt ($n = 12$), és ezen paraméter tekintetében nem találtunk különbséget a felszínesen vagy mélyen elhelyezkedő sejtek között. Az egyik ependymalis felszínhez közeli PLC spontán, 11,5 Hz frekvenciájú AP-tüzelést mutatott, a többi tizenegy vizsgált sejt azonban nem. Áram-clamp üzemmódban, 500 ms időtartamú, küszöb feletti depolarizáló impulzust alkalmazva, nem-adaptálódó-típusú AP-tüzelést tapasztaltunk ($n = 6$; mind felületesen elhelyezkedő sejt; 8A ábra).

A következő lépésben a hiperpolarizáló hatású stimulusok hatását vizsgáltuk. Ennek során először áram-clamp üzemmódban alkalmaztunk hiperpolarizáló feszültséglépcsőket,

aminek következtében a sejtek membránpotenciálja először jelentősen hiperpolarizálódott (8B ábra; nyíllal jelölt rész), majd egy csúcspont elérését követően pozitívabb szinten stabilizálódott (8B ábra). Az átmeneti hiperpolarizáció felvetette annak a lehetőségét, hogy a PLC-k rendelkeznek egy hiperpolarizáció által aktivált ionárammal. Ezen hipotetikus áram jelenlétének igazolása végett feszültség-clamp méréseket végeztünk, aminek során a membránpotenciált -60 mV-ról -140 mV-ig változtattuk, 10 mV-os feszültséglépcsőkben. A 8C ábrán látható, hogy a növekvő hiperpolarizáció hatására egy egyre nagyobb amplitúdójú, lassan aktiválódó és befelé irányuló áram alakult ki. Az üres nyíl a feszültséglépcsők elejéhez tartozó azonnali, a kitöltött nyíl pedig a feszültséglépcsők végén mért maradó áramamplitúdókat jelöli. A -140 mV-os feszültséglépcsőhöz tartozó, a hiperpolarizáló impulzus végén meghatározott átlagos áramsűrűség $13,2 \pm 4,5$ pA/pF volt ($n = 4$). Ezen paraméter tekintetében sem találtunk különbséget a felületesen és a mélyen elhelyezkedő sejtek között. Amennyiben az extracelluláris oldatot 10 μ mol/l ZD7288-al egészítettük ki (8D ábra), a hiperpolarizáló feszültséglépcső alatt lassan aktiválódó áramkomponens eltűnt. A hiperpolarizáció hatására aktiválódó áramféleséget lassú aktivációja és ZD7288-al szemben mutatott érzékenysége alapján a hiperpolarizáció-aktivált nem-specifikus kationárammal (I_h) azonosítottuk. A 8E ábrán azon biocitinnel töltött PLC kis és nagy nagyítású konfokális mikroszkópos képe látható, amiről az előző képeken bemutatott elektrofiziológiai mérések is készültek. A sejt a subependymalis lokalizáció és a jellegzetes morfológiai jegyek alapján egyértelműen PLC-ként azonosítható.



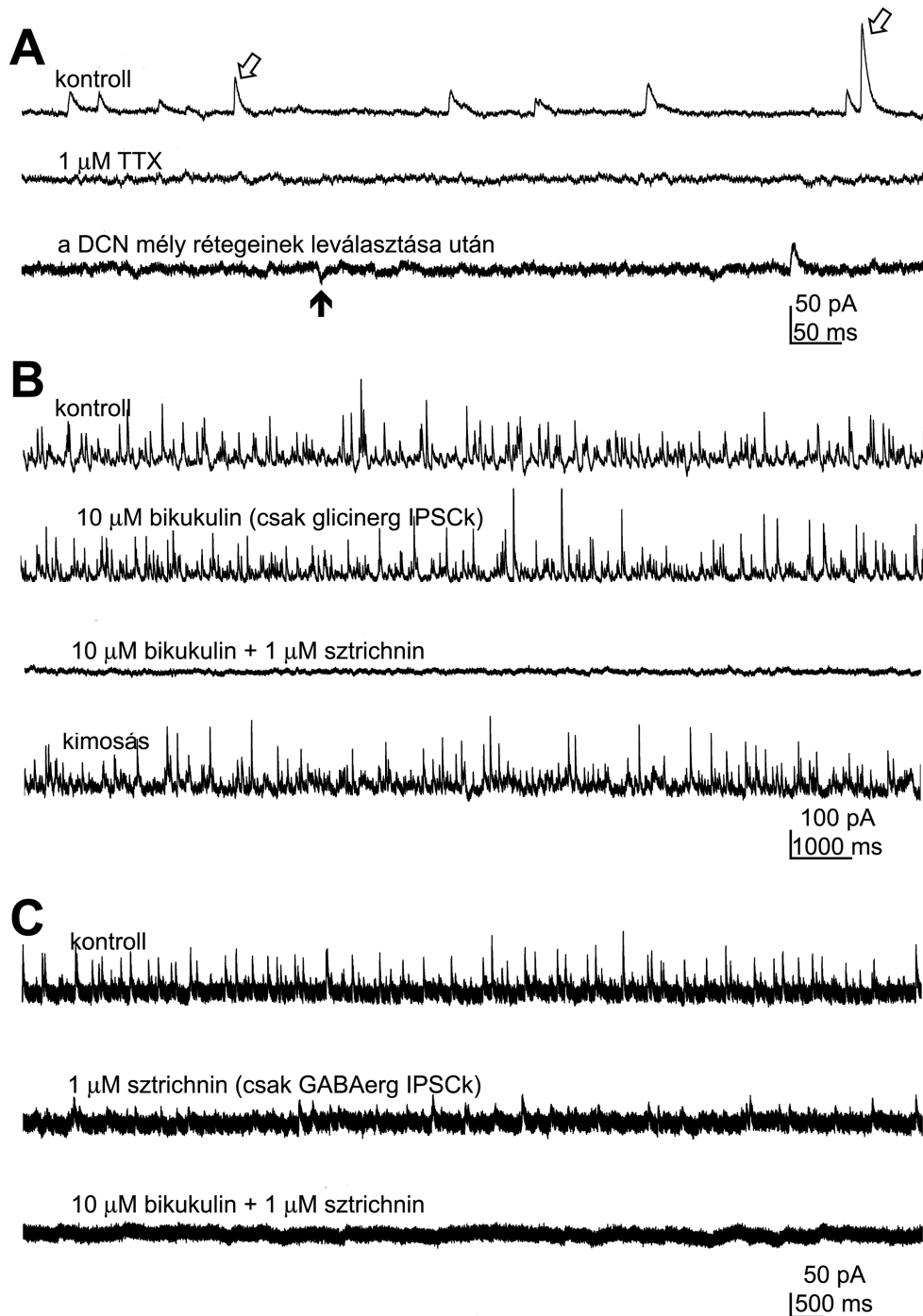
8. ábra. A Purkinje-szerű sejtek aktív membránsajátságai. (A) Az (E) képen látható PLC-ről elvezetett áram-clamp regisztrátum. A sejt nyugalmi membránpotenciálja -58 mV volt. A sejt az 500 ms hosszú, 1 nA nagyságú depolarizáló áraminjekció alkalmazására AP-sorozat tüzelésével reagált. (B) Ugyanazon sejt által produkált membránpotenciál-változás, ami 500 ms hosszú, növekvő amplitúdójú, hiperpolarizáló áraminjekciók hatására alakult ki. Az üres nyíl az implulzus elején kialakuló, jellegzetes, erőteljes hiperpolarizációs választ jelöli, amit – még az áraminjekció alatt – részleges depolarizáció követ. (C) Ugyanazon sejtről elvezetett feszültség-clamp

regisztrátum, 2 s hosszú, hiperpolarizáló hatású feszültséglépcsők alkalmazása során. A -60 mV-os tartópotenciálról kiindulva, növekvő amplitúdójú, hiperpolarizáló feszültséglépcsőket alkalmaztunk. A feszültséglépcső nagysága 10 mV volt. Üres nyíl jelzi a feszültséglépcső elején mérhető azonnali, kitöltött nyíl pedig a feszültséglépcső végén mért maradó áramot. **(D)** Ugyanazon sejtről, a (C) panelen bemutatottal megegyező feszültséglépcsők alkalmazása során, de ZD7288 jelenlétében rögzített áramgörbék. **(E)** Az előző ábrákon látható elektrofiziológiai mérések során biocitinnel feltöltött PLC rekonstruált képe. A kis felvételen ugyanezen sejt látható kis nagyítással, amin megítélhető annak DCN-en belüli helyzete. A kalibráció az (E) panelen 20 μm , annak kis nagyítású részén 100 μm .

A következőkben azt vizsgáltuk, hogy léteznek-e funkcionális szinaptikus kapcsolatok a PLC-k és a nucleus cochlearis más neurontípusai között. Ennek érdekében -60 mV-os tartópotenciál mellett feszültség-clamp méréseket végeztünk, amik során spontán posztszinaptikus áramokat igyekeztünk regisztrálni. A 9A ábra felső sorában látható, hogy ezen mérések során jelentős számban rögzítettünk a regisztrátumokon pozitív kitérésekként azonosítható spontán, gátló hatású posztszinaptikus áramokat (IPSC-k). Az IPSC-k átlagos frekvenciája kontroll körülmények között 14 ± 2 Hz volt. A feszültségfüggő nátriumcsatornákat gátló tetrodotoxin (TTX) jelenlétében ez az érték $0,4 \pm 0,1$ Hz-re csökkent ($n = 4$). Ez a megfigyelés arra utal, hogy a spontán IPSC-k kialakulása preszinaptikus AP-ok jelenlétéhez kötött. Az IPSC-k frekvenciájának jelentős, 98%-os csökkenését figyeltük meg, akkor is, amikor a felszínesen elhelyezkedő PLC-k alatt végzett sértéssel elválasztottuk őket a mag mélyebb rétegeitől, így az ott található neuronoktól ($n = 3$). Ezen kísérletek eredménye arra utalt, hogy az IPSC-k megjelenése a mag mélyebb rétegeiben elhelyezkedő gátló interneuronok aktivitásához köthető. Azokban az esetekben amikor a PLC-k és a DCN mélyebb rétegei közötti kapcsolatokat átvágtuk, az IPSC-k eltűnése után jól megfigyelhetővé váltak a kisebb amplitúdójú, serkentő hatású posztszinaptikus áramok (EPSC-k) is. Ezen EPSC-k jelenlétét kontroll körülmények között (azaz a PLC-k alatt végzett sértés nélkül) feltehetően elfedték a jóval robosztusabb megjelenésű IPSC-k. Bár az EPSC-eket nem vizsgáltuk részletesebben, forrásuk legvalószínűbb jelöltjei a mag legfelületesebben elhelyezkedő sejtjei, a glutamaterg szemcsesejtek.

A kísérletek következő fázisában azt vizsgáltuk meg, hogy az IPSC-k kialakulása milyen neurotranszmitterek hatásának tulajdonítható. A 9B ábrán látható, hogy a GABA-receptor-antagonista bikukullin önmagában csak kis mértékben csökkentette az IPSC-k frekvenciáját, ugyanakkor a glicinreceptor-antagonista sztrichninnel együttesen alkalmazva az IPSC-k frekvenciája közel nullára volt redukálható ($n = 4$). A sztrichnin önmagában is hatékonyan csökkentette az IPSC-k frekvenciáját (9C ábra; $n = 4$). Ezen kísérletek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a PLC-keket elérő IPSC-k 76%-a glicinerg, a fennmaradó 24%-a pedig GABAerg receptorok közreműködésével alakul ki. A kétféle gátló hatású

posztszinaptikus áram nem csupán a frekvenciájában, de az amplitúdójában is lényeges különbséget mutatott; a glicinerg IPSC-k amplitúdója jelentősen meghaladta a GABAerg aktivitásból származó posztszinaptikus áram nagyságát.

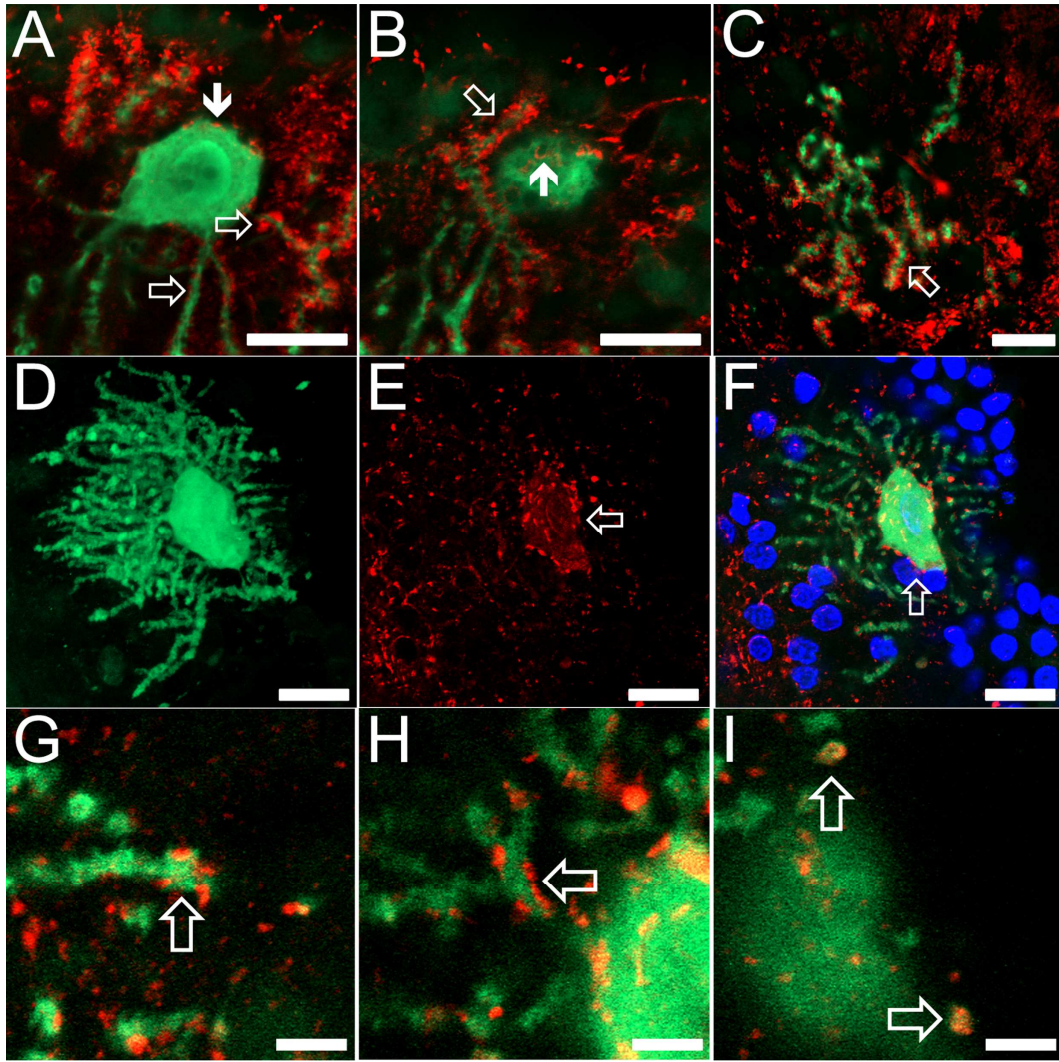


9. ábra. A Purkinje-szerű sejtekről elvezethető spontán posztszinaptikus áramok. A tartópotenciál minden esetben -60 mV volt, és a spontán (ingerlés nélkül) megjelenő membránáramokat rögzítettük. Az (A) rész felső regisztrátumán a spontán IPSC-k felfelé irányuló kitérések formájában láthatók, melyek közül kettőre üres nyilak mutatnak. A középső regisztrátumon TTX hatása látható ugyanazon sejt posztszinaptikus áramaira. Az alsó regisztrátumon egy másik PLC posztszinaptikus áramai figyelhetők meg, de ebben az esetben a felvétel a mag mély rétegeinek leválasztása után készült. A kitöltött nyíl egy spontán EPSC-re

mutat. A **(B)** és a **(C)** paneleken glicinerg és GABAerg spontán IPSC-k farmakológiai elkülönítése látható. Amint az a **(B)** és **(C)** panelek összehasonlítása alapján megfigyelhető, a PLC-k spontán IPSC-inek nagy százaléka glicinerg. A paneleken belül az egyes regisztrátumok a rögzítésük sorrendjében láthatóak. A kalibráció a paneleken belüli regisztrátumok esetében azonos, de különbözik az egyes panelek között.

Calbindin- és szinaptofizin-specifikus kettős immunjelölés

Az előzőekben részletezett funkcionális adatok alapján nemcsak az vált nyilvánvalóvá, hogy a PLC-k képesek akciós potenciálok tüzelésére, de az is valószínűnek tűnt, hogy ezek a neuronok aktív részét képezik a DCN neuronhálózatának. Annak érdekében, hogy képet kapjunk a PLC-ket elérő szinaptikus végződés feltételezhető szerveződéséről, szinaptofizin- és calbindin-specifikus kettős immunjelölést végeztünk. A szinaptofizin a preszinaptikus terminálisok ismert markere (Wiedenmann és Franke, 1985), így a szinaptofizin-pozitív axonvégződéseknek a célneuron közelében történő megjelenése esetleges szinaptikus kapcsolatok létre utal. Bár ezen szoros appozíciók jelenléte és a szinapszisok *de facto* léte közötti kapcsolat minden kétséget kizáró igazolása elektronmikroszkópos vizsgálatot kíván, a konfokális mikroszkópos vizsgálatok – a funkcionális adatok eredményeivel kombinálva – elegendőek lehetnek a szinaptikus kapcsolatok létezésének megalapozott felvetésére. Ezen cél érdekében kerestünk szoros appozíciós helyeket a calbindin-pozitív PLC-k és a szinaptofizin-pozitív struktúrák között. A 10. ábra A–C felvételein a zöld fluoreszcens jel a calbindin-, a piros pedig a szinaptofizin-immunpozitív struktúrák megoszlását mutatja a nucleus cochlearis dorsalisban. A nyilak minden esetben a calbindin-pozitív PLC-k és a szinaptofizin-pozitív axonvégződések szoros közelségére hívják fel a figyelmet. Mind a PLC sejttestek (kitöltött nyilak a 10A és B képeken), mind a PLC dendritek szoros közelségében találtunk szinaptofizint expresszáló struktúrákat, amik gyakorta igen nagy sűrűségben borították a dendritikus nyúlványokat (pl. az üres nyilakkal jelölt részletek a 10A–C felvételeken).



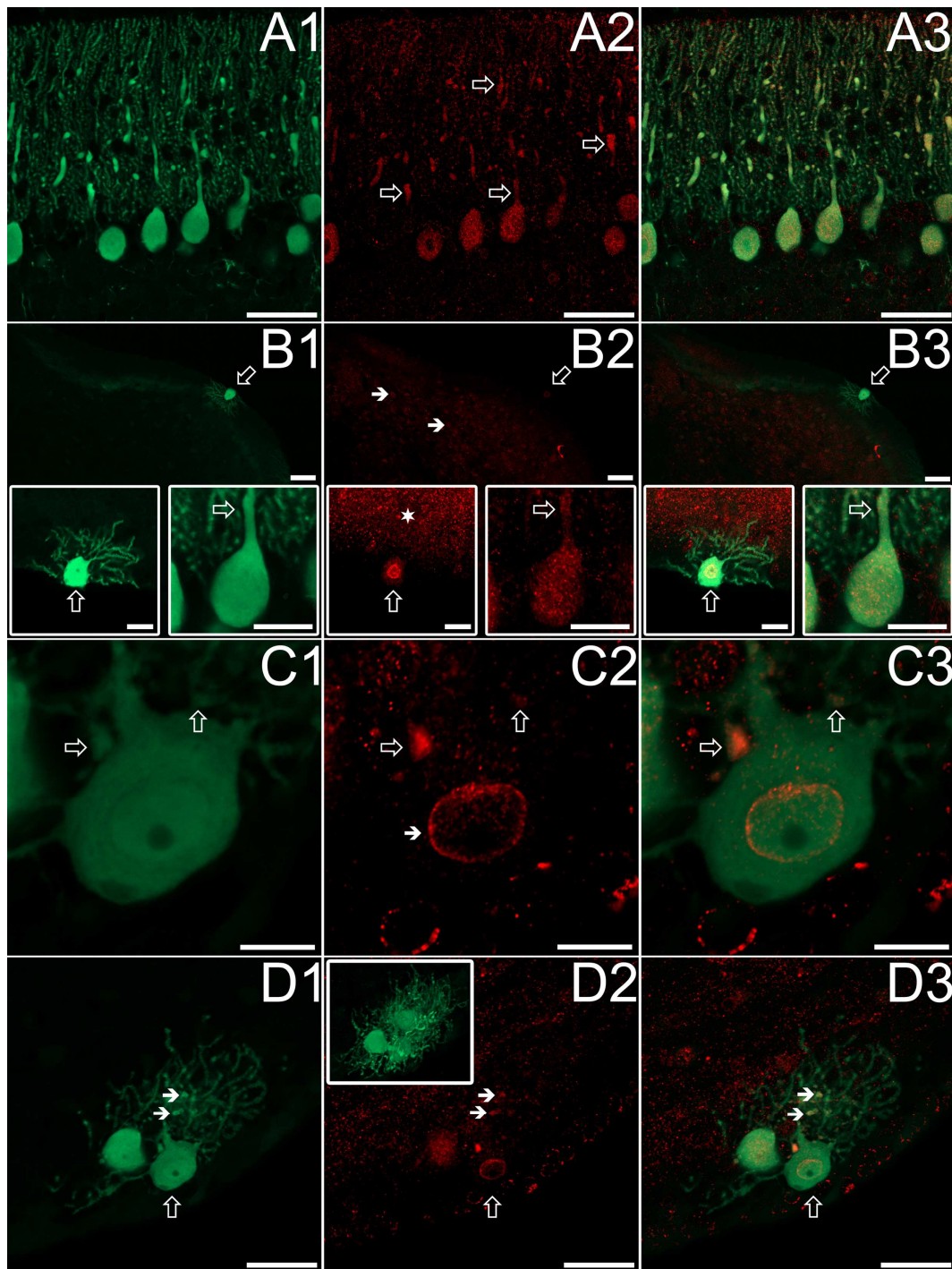
10. ábra. Calbindin- és szinaptofizin-, valamint calbindin- és GAD-specifikus kettős immunjelölés. (A) Szinaptofizin-pozitív struktúrák (piros) eloszlása egy calbindinnel jelölt PLC (zöld) környezetében. A kitöltött nyíl egy a szómával kapcsolatot létesítő terminálásra mutat, az üres nyílak dendritekkel szinaptizáló terminálisokat jelölnek. (B) Az előzőhöz képest 6 μm -rel felszínebben futó optikai szelet, amelyben ugyanazon PLC sejtestének felszíne látható. A kitöltött nyíl egy a sejtesttel kapcsolatot létesítő terminálásra mutat, míg az üres nyíl egy axonvégződésekkal sűrűn borított dendritet jelöl. (C) A kép a (B) panelen láthatóhoz képest 43 μm -rel felszínebben készült. Jól megítélhető, hogy az összes dendritet sűrűn borítják a szinaptikus terminálisok (pl. lásd az üres nyíllal jelölt dendritszakaszt). (D) Egy PLC calbindin-specifikus immunjelölés alapján készített rekonstrukciója. Az (E–I) panelek a (D) felvételen bemutatott PLC GAD-specifikus immunjelölődését mutatják. (E) Szintén a (D) panelen látható sejt GAD-specifikus immunjelölése alapján készült rétegfelvétel. A nyíl a GAD pozitív szóma helyét jelöli. (F) Az (E) panelen látható GAD-specifikus jelölődés és az azonos síkból származó calbindin-specifikus jelölődés egymásra vetítése, a sejtmagok DAPI-jelölésével kiegészítve. Mind a szóma belsejében, mind pedig annak felületén láthatóak GAD-pozitív struktúrák. Az üres nyíl a szómával kapcsolatot létesítő GAD-pozitív terminálisokat jelöl. (G) Dendritikus tüskékkel rendelkező dendrit nagy nagyítású képe. A nyíl GAD-pozitív terminálisokat mutat. (H) A nyíl olyan GAD-pozitív terminálisokat jelöl, amik egy proximális dendriten végződnek. (I) GAD-pozitív jelölődés a PLC dendritjein belül is látható volt (nyílak). Kalibráció: 20 μm (A–F) és 5 μm (G–I).

Calbindin- és glutamát-dekarboxiáz-specifikus kettős immunjelölés

A PLC-k által felszabadított neurotranszmitter azonosítása érdekében glutamát-dekarboxiláz- (GAD) specifikus immunhisztokémiai jelölést is végeztünk, amit – a PLC-k könnyű azonosíthatósága érdekében – mindig calbindin-specifikus immunjelöléssel kombináltunk (10D–I ábrák). GAD nélkül a GABA szintézise lehetetlen, így az enzim neuronokon belüli expressziója azok GABAerg természetére utal. Az általunk megfigyelt összes Purkinje-szerű sejt GAD-pozitívnak bizonyult. Kisagyból és nucleus cochlearis dorsalisból készített szeletek egyszerre történő immunjelölése után megállapítottuk, hogy az azokban található Purkinje- és Purkinje-szerű sejtek calbindin- és GAD-specifikus jelölésének erőssége azonos. A PLC-k sejttestének GAD-pozitivitásán kívül szembeötlő volt még a szóma és a dendritek szoros közelségében végződő, GAD-pozitív axonvégzódások nagy száma (néhány ilyen struktúrát üres nyíllal jelöltünk a 10F–H képeken). A 10I felvételen az üres nyilak egyes PLC nyúlványok GAD-pozitivitására hívják fel a figyelmet, ahol a jelölődés inkább intracelluláris elhelyezkedésűnek tűnik. A sejttest és egyes nyúlványok intenzív GAD-pozitivitásából arra következtettünk, hogy a nucleus cochlearis dorsalis Purkinje-szerű sejtjei GABAerg gátlóneuronok.

Calbindin- és cerebellin-1-specifikus kettős immunjelölés

Hagyományos, beágyazott szövettani preparátumokban már korábban igazolták a cerebellin nevű fehérje jelenlétét a kisagy Purkinje- és a nucleus cochlearis dorsalis Purkinje-szerű sejtjeiben egyaránt (Slemmon és mtsai 1985, Mugnaini és Morgan 1987). Saját vizsgálatsorozatunk következő lépésében azt vizsgáltuk, hogy konfokális mikroszkópia alkalmazásával vajon sikerül-e valamilyen különbséget feltárni ezen két sejtípus cerebellin-1-specifikus immunjelölődésének megoszlásában. A 11A1 ábrán a zöld fluoreszcens jel a kisagyban tapasztalt calbindin-, a 11A2 képen bemutatott piros fluoreszcens szignál pedig ugyanezen látótér cerebellin-1-specifikus jelölődési mintázatát demonstrálja. A 11A3 ábra ezen felvételek egymásra vetítésével készült. Megállapítható, hogy – várakozásainknak megfelelően – a kisagyi Purkinje-sejtek mindkét fehérjét expresszálták. A cerebellin-1-specifikus immunpozitivitás egyértelműen jelen volt a sejttestekben és a dendritekben egyaránt; utóbbi esetben elsősorban a proximalis dendritekben megfigyelhető intenzív jelölődés érdemel figyelmet (lásd például a nyíllal jelölt képleteket a 11A2 ábrán).



11. ábra. Cerebellin-1-szerű immunjelölődés a nucleus cochlearis dorsalisban és a kisagyban. (A1) Calbindin-pozitív kisagyi Purkinje-sejtek. (A2) Az előző képen látható sejtek cerebellin-1 immunjelölődése. A nyilak néhány intenzív cerebellin-pozitivitást mutató dendritre mutatnak. (A3) Az (A1) és (A2) képek egymásra vetítése. (B1; fő panel) A DCN calbindin-specifikus jelölésének kis nagyítású képe. Az üres nyíl egy PLC-re mutat. (B1; bal ábra) A fő panelen látható PLC nagy nagyítású, elforgatott képe, az üres nyíl a számára mutat. (B1; jobb ábra) Egy kisagyi Purkinje-sejt calbindin jelölődésének nagy nagyítású képe. Az üres nyíl a proximális dendritre mutat. (B2) A kép elrendezése megegyezik a (B1) kép elrendezésével, de ebben az esetben a cerebellin-1 immunjelölődés látható. A fő panelen az üres nyíl az előző panelen is látható PLC-t jelöli, a kitöltött nyilak a DCN egyéb, cartwheel-sejtekként azonosított, cerebellin-pozitív sejteire mutatnak. A csillag a DCN molekuláris rétegének cerebellin-pozitivitását jelöli. (B3) A B1 és B2 képek megfelelő részeinek egymásra vetítése. (C1–C3) Egy PLC calbindin- (C1) és cerebellin-specifikus (C2) immunjelölődésének nagy nagyítású képe. (C3) A (C1) és (C2) képek

egymásra vetítése. Az üres nyílak erősen calbindin- és cerebellin-pozitív PLC dendritszakaszokra mutatnak. A kitöltött nyíl a (C2) panelen a PLC erősen cerebellin-pozitív perinukleáris részét jelöli. **(D1–D3)** A C1–C3 képeken bemutatott PLC calbindin- **(D1)** és cerebellin-specifikus **(D2)** immunjelölődéséről készített kisebb nagyítású rétegfelvételek. A **(D3)** a (D1) és a (D2) képek egymásra vetítését mutatja. Az üres nyíl a (C) képen is látható szómát jelöli. A kitöltött nyílak az erősen cerebellin-pozitív dendritikus szakaszokat jelölik. A **D2 felvételen látható kisebb kép** a (D1)-en bemutatott képhez tartozó látótér teljes vastagságú rekonstrukciója. Kalibráció: 50 μm (A1–B3) és (D1–D3) fő panelek; 20 μm (B1–B3) kis képek; és 10 μm (C1–C3).

Cerebellin-1-specifikus immunpozitivitás a DCN-ben is kimutatható volt. A PLC-k cerebellin-1 expresszióját calbindin- (11B1 ábra) és cerebellin-1- (11B2 ábra) specifikus kettős immunhisztokémiai kísérletekben erősítettük meg. Érdekes rámutatni, hogy a PLC-k esetében a cerebellin sejten belüli elhelyezkedése – a kisagyi Purkinje-sejtektől eltérően – jórészt a sejttestre korlátozódott, és a dendritok csak ritkán mutattak könnyen megítélhető jelölődést. A két sejttípus cerebellin-1-specifikus immunjelölődésének megoszlása a 11. ábra B1–B3 nagy nagyítású képei segítségével hasonlítható össze. A nucleus cochlearis dorsalis molekuláris rétegében (a csillaggal jelölt rész a 11B2 ábrán), valamint mély rétegének egyes sejttesteiben (ezek közül néhányat kitöltött nyíl jelez a 11B2 ábrán) is megfigyelhető volt cerebellin-1-specifikus immunpozitivitás. Nagyobb nagyítással vizsgálva, a PLC-k esetében a cerebellin-1 jelenléte a sejtmag körül volt a legkifejezettebb (11C2 ábra; kitöltött nyíl), bár a fehérje néhány esetben a nyúlványokban is szembetűnő volt (11C1–C3 képek; üres nyílak). A 11D1–D3 felvételeken üres nyíl jelöli azt a PLC-t, amit a 11C1–C3 képeken nagyobb nagyítással már bemutattunk; itt a kitöltött nyílak szintén néhány dendrit markáns cerebellin-1-pozitivitására hívják fel a figyelmet. A 11D képsorozaton az is megfigyelhető, hogy a PLC-k időnként csoportokban rendeződve helyezkedtek el.

A nucleus cochlearis dorsalis szemcsesejtjeit befolyásoló kolinerg moduláció vizsgálata

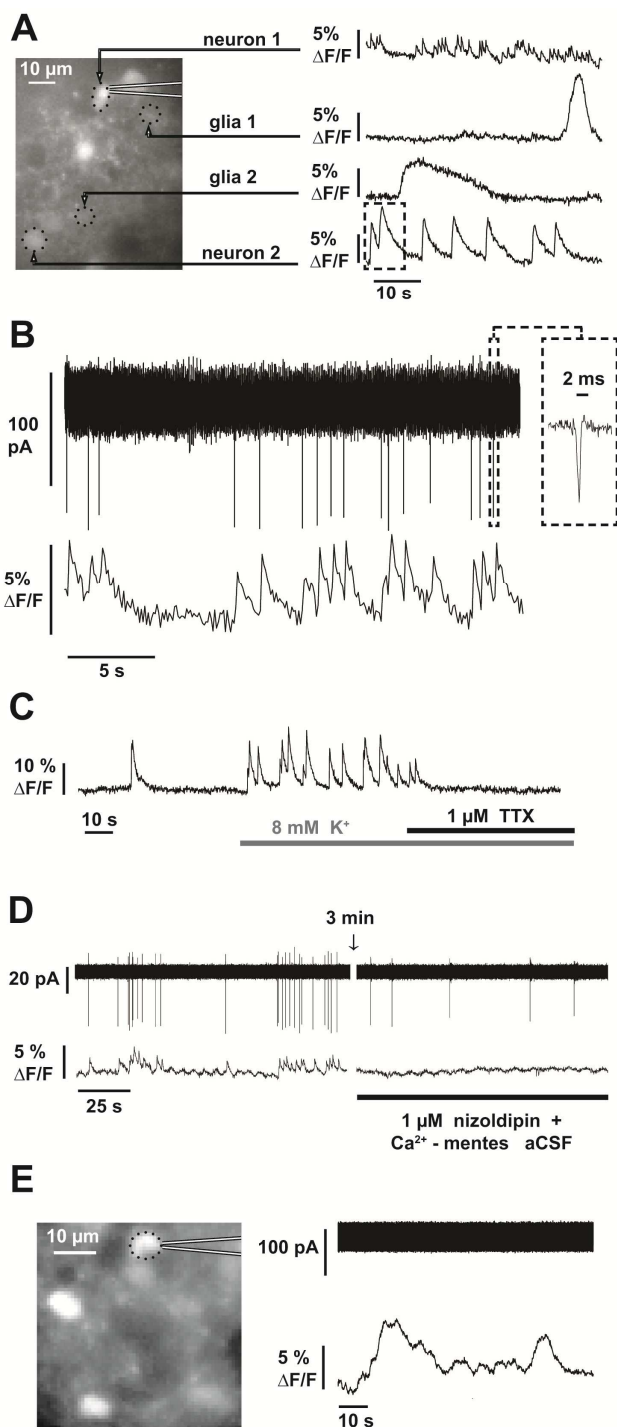
A kísérletek következő fázisában az egyik olyan neurontípus vizsgálatára összpontosítottunk, ami – részben a saját, és a fentiekben már ismertetett kísérletes adatok szerint – befolyásolhatja a Purkinje-szerű sejtek, és természetesen számos egyéb neuronféleség, aktivitását. A szemcsesejtek viselkedésének megértésével közelebb kerülhetünk a PLC-k nucleus cochlearisban elfoglalt helyének és funkciójának pontos leírásához. Reméltük továbbá, hogy a tervezett vizsgálatsorozat által feltárt eredmények hozzásegítenek ahhoz is, hogy pontosabb képet alkossunk a DCN-ben zajló jelfeldolgozás kolinerg modulálhatóságának mikéntjéről.

A nucleus cochlearis dorsalisban kialakuló kalciumtranziensek jellemzése

A DCN szemcsesejtek kolinerg befolyásolhatóságát intracelluláris kalciumkoncentráció-méréssel vizsgáltuk, amihez OGB-AM kalciumindikátor-festékkel töltött, túlélő agyszeleteket alkalmaztunk. Bár a szeletben mért fluoreszcenciaintenzitás-változások időbeli lefutása igen változatosnak bizonyult, azokat megjelenésük alapján két nagy csoportba oszthattuk. Egyes sejtek gyors, repetitív kalcium-jeleket, mások pedig inkább lassú lefutású Ca^{2+} -jeleket produkáltak (12A ábra). A gyors típusú kalciumjelek felszálló szára meredek, míg leszálló szára elnyúltabb volt. Az ezen gyors lefolyással jellemezhető, egymást követő Ca^{2+} -tranziensek egyes esetekben részlegesen vagy teljesen összeolvadtak. Utóbbi jelenséget jól példázzák a 12A ábrán, a „neuron-2” esetében szaggatott vonallal megjelölt, részlegesen összeolvadt tranziensek.

Annak érdekében, hogy a gyors tranziensek feltételezhető, és más agyterületeken korábban már leírt, akciós potenciálokhoz kapcsolt eredetét bizonyítsuk, egyidejű kalciumkoncentráció- és „loose-patch”-méréseket végeztünk. A 12B ábra alapján jól megítélhető, hogy a gyors típusú Ca^{2+} -tranzienseket mindig áramtűskék előzték meg. Az áramtűskék amplitúdójának 50%-ánál mérhető átlagos időtartam $0,75 \pm 0,01$ ms volt ($n = 87$), ami arra enged következtetni, hogy ezen áramjelek neuronális akciós potenciáloknak felelnek meg. Egy ilyen áramtűskét nagyobb időbeli felbontással is bemutatunk a 12B ábrán.

A gyors típusú kalciumjelek AP-kapcsolt voltát a feszültségfüggő nátriumcsatornák egy specifikus gátlószerének alkalmazásával is megerősítettük ($1 \mu\text{mol/l}$ TTX). A 12C ábrán egy ilyen kísérlet eredményét demonstráljuk. Ennek során először 8 mmol/l -re emeltük az extracelluláris oldat K^{+} -koncentrációját, ezzel váltva ki a sejtek depolarizációját és akciós potenciálok tüzelését, aminek következtében gyors típusú kalciumtranziensek jelentek meg. A következő lépésben tetrodotoxinnal gátoltuk az akciós potenciálok kialakulását, amivel párhuzamosan eltűntek a gyors kalciumjelek. Hasonló megállapításra jutottunk valamenyi hasonló kísérlet esetében (négy, K^{+} -depolarizációra reagáló, és két különböző agyszeletben elhelyezkedő sejt).



12. ábra. OGB-vel töltött nucleus cochlearis sejtek intracelluláris kalciumkoncentráció-változásai és elektromos aktivitása. (A) Nagy nagyítású fluoreszcens kép egy DCN szeletről (bal oldal). A loose-patch méréshez használt pipetta és négy ROI körvonalai külön jelölve vannak. Az ábra jobb oldalán a megjelölt négy ROI kalciumkoncentráció-változásai láthatók. A regisztrátumokat nyilak kötik össze a nekik megfelelő ROI-kkal. A „neuron 2”-höz tartozó fluoreszcens regisztrátumon a szaggatott keretben két, részlegesen összeolvadt kalciumtransziens figyelhető meg. **(B)** Az (A) képen „neuron 1”-ként jelölt sejt elektromos aktivitásának (loose-patch; felső sor) és fluoreszcenciájának (alsó sor) egyidejű változásai. A kis kép nagyobb időbeli felbontással mutat egy áramtűskét. **(C)** Káliumdepolarizációval kiváltott gyors típusú kalciumtransziensek, amik TTX jelenlétében eltűnnek. Az inkubációs időket vízszintes vonalak jelölik. **(D)** Egyidejű áram- (loose-patch; felső sor) és fluoreszcenciamérés (alsó sor); kontroll körülmények között (aCSF; bal oldal) és három perccel a nifedipinnel kiegészített, kalciummentes aCSF-re váltás után (jobb oldal). **(E)** Nagy nagyítású, fluoreszcens felvétel egy OGB-vel töltött DCN szeletről (bal oldal). A pipetta és a vizsgált ROI kontúrjai jelölve vannak. A kiemelt ROI-hoz tartozó egyidejű áramregisztrátum (loose-patch) és fluoreszcenciaváltozás a jobb oldalon látható.

A következő lépésben a feszültségfüggő kalciumcsatornákon keresztül az extracelluláris térből történő kalciumbelépés szerepét vizsgáltuk a gyors típusú kalciumjelek kialakulásában. Ezekben a kísérletekben először névlegesen nulla kalciumkoncentrációjú extracelluláris oldatban inkubáltuk a szeleteket (10–30 perc), majd párhuzamos „loose-patch” és kalciumkoncentráció-mérést végeztünk (két állatból származó, $n = 3$ sejt). A megadott körülmények között először a gyors Ca^{2+} -transziensek amplitúdójának jelentős csökkenését,

majd az AP-tüzelés megszűnésével párhuzamosan a kalciumtranziensek teljes eltűnését tapasztaltuk. Ez a kísérletes elrendezés azonban a szeletek túlélését jelentősen rontotta, mivel hosszú ideig tartó, igen alacsony Ca^{2+} -koncentrációjú oldatban történő inkubációt kívánt. Ezt megelőzendő, egyes esetekben az extracellularis kalcium elvonását az L-típusú feszültségfüggő kalciumcsatornákat gátló nisoldipin ($1\text{ }\mu\text{mol/l}$) alkalmazásával kombináltuk (12D ábra). Amint az megfigyelhető, ezen kísérletek esetében a kalciumtranziensek eltűntek, ugyanakkor az akciós potenciálok tüzelése változatlanul megfigyelhető volt (két, ugyanazon állatból származó sejt, $n = 2$ sejt). Ezek a kísérletek azt mutatták, hogy a gyors típusú kalciumtranziensek kialakulásához akciós potenciálok és az extracelluláris térből belépő kalciumionok szükségesek.

Hasonló kísérletes elrendezést alkalmazva vizsgáltuk még a lassú típusú kalciumjelek esetleges akcióspotenciál-kapcsoltságát is. A 12E ábrán egy lassú típusú kalciumjelet produkáló sejt Ca^{2+} -tranzienseit és egyidejűleg készített „loose-patch” regisztrátumát demonstráljuk. Két sejtről elvezetett, mindösszesen 15 lassú kalciumtranziens közül egy esetben sem tapasztaltunk akcióspotenciál-tüzelést; sem a tranziens időtartama alatt, sem azt megelőzően. Ezen megfigyelés alapján arra következtettünk, hogy a lassú kalciumkoncentráció-változások nem neuronális aktivitást tükröznek. Úgy gondoljuk, hogy azok megjelenése valószínűleg egyes gliasejtek (pl. astrocyták) működéséhez köthető.

A kalciumtranziensek kvantitatív jellemzése

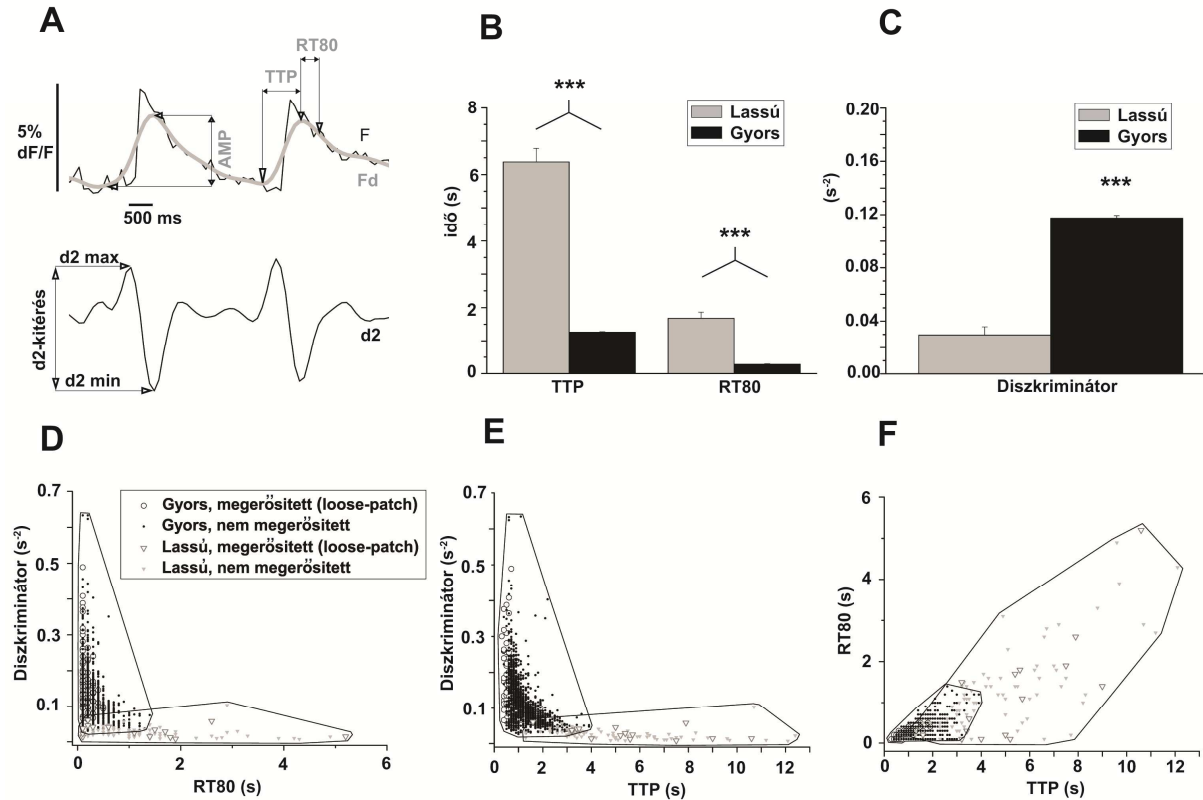
A 12. ábrán bemutatott és azokhoz hasonló kalciumtranziensek általában könnyen azonosíthatók és besorolhatók voltak a „lassú” és „gyors” csoportokba. Voltak azonban olyan esetek is, amikor sem a tranziensek felismerése, sem azok osztályozása nem volt ennyire magától értetődő. Az ilyen, pontosan nem megítélhető Ca^{2+} -tranziensek detektálására és objektív klasszifikálására ezért egy számítógépes módszert fejlesztettünk ki, ami képes volt a megfelelő adatok fél-automatikus kiértékelésére. Az eljárás a sejtkontúrok (ROI-k) manuális kijelöléséből; vizuálisan ellenőrzött és jóváhagyott, de automatikus tranziensfelismerésből és automatikus tranziens kategorizálásból állt. Az egyes kalciumjelek kinetikai paramétereit a kiértékelő program szintén automatikusan határozta meg, így lehetővé vált a sok sejtről egyidejűleg regisztrált, nagyszámú kalciumtranziens elemzése.

A 13A ábrán egy nyers (azaz nem zajsztűrt) fluoreszcenciaregisztrátum (F) és annak zajsztűrt változata látható (Fd). A program minden egyedi Ca^{2+} -tranziens esetében 9 kinetikai paramétert határozott meg, amihez a zajsztűrt görbéket használta fel. A vizsgált paraméterek közül hét a biológiai jelek elemzése során közönségesen használt; ilyen az amplitúdó (AMP),

a felszállószár maximális meredeksége, a maximum eléréséhez szükséges idő (*time-to-peak*, TTP), a görbe alatti terület, valamint az az időtartam, ami ahhoz szükséges, hogy a fluoreszcenciaintenzitás visszatérjen az amplitúdó 80, 50 és 20%-ára (RT80, RT50, RT20). Amint arra korábban már rámutattunk, a zajszűrés némileg torzította a kalciumjelek alakját, ami a gyors típusú Ca^{2+} -tranziensek felszálló szárán, azaz a jel leggyorsabb komponense esetében volt a legnyilvánvalóbb (13A ábra). Mivel a kinetikai paraméterek meghatározása a zajszűrt görbék kalciumtranziensei alapján történt, a jelen kísérletekben meghatározott TTP értékek kizárólag a gyors és lassú típusú tranziensek megkülönböztetésére alkalmasak, és nem hasonlíthatók össze a más szerzők által publikált TTP értékekkel.

A fent leírt, szokásosan meghatározott paramétereken kívül két másik jellemzőt is kiszámítottunk. A „d2-kitérés” a zajszűrt görbe második deriváltján meghatározott, ugyanazon Ca^{2+} -tranzienshez tartozó maximum- és minimumértékek – azaz az adott jelhez tartozó fluoreszcenciaváltozás legnagyobb pozitív és negatív gyorsulása – közötti különbség. A „diszkriminátor” nevű paramétert a „d2-kitérés” és a tranziens amplitúdójának hányadosaként származtattuk.

A 13B és C ábrákon az összes vizsgált gyors ($n = 1679$) és lassú ($n = 70$) típusú tranziensre vonatkozó kinetikai paraméterek átlagértékeit demonstráljuk. Megfigyelhető, hogy a gyors típusú kalciumtranziensek felszálló szárának időtartama (TTP) jelentősen rövidebb, mint a lassú tranzienseké. Az RT80 értékek (13B ábra) és a „diszkriminátor” (13C ábra) ugyancsak szignifikánsan különbözött a két típusba sorolható tranziensek esetében. Ezen paraméterek változékonyságát, és a „diszkriminátor”-nak a Ca^{2+} -tranziensek elkülönítésében betöltött jelentőségét illusztrálja a 13D–F ábra. A bemutatott esetekben az összes egyedi Ca^{2+} -jelet tüntettük fel a fenti három paraméter közül valamelyik kettő által meghatározott síkban. A lassú és gyors típusú tranziensek jobb elkülöníthetősége érdekében a két csoport tagjait a szélsőértékek összekötésével kapott sokszögekkel határoltuk körül. Az ábrák megtekintése után nyilvánvaló, hogy a „diszkriminátor” TTP-vel vagy RT80-nal való kombinálása (13D és E ábrák) lényegesen jobb elkülönítést eredményez, mint a TTP és RT80 paraméterek kombinálása (13F ábra).



13. ábra. A kalciumtranzienseket kiértékelő program által meghatározott kinetikai paraméterek. (A) A felső sorban a nyers (F; vékony fekete) és zajsztűrt (Fd; vastag szürke) fluoreszcens regisztrátumok láthatóak. Az alsó sor az Fd második deriváltját (d2) mutatja. AMP: a tranziens amplitúdója az Fd-n; TTP: a csúcs eléréséhez szükséges idő az Fd-n; RT80: az amplitúdó 80%-ára való visszatéréshez szükséges idő az Fd-n. Az alsó sorban a d2 kitérés meghatározása látható. A (B) és (C) képeken három kinetikai paraméter átlagai láthatók, az összes gyors ($n = 1679$) és az összes lassú kalciumtranziens ($n = 70$) figyelembe vételével. A (B) panelen a TTP és az RT80, a (C) panelen pedig a „diszkriminátor” átlagai láthatók. ***: $p < 0,001$. (D–F) Szórási diagramok, ahol minden egyes pont egy kalciumtranziensnek felel meg a tengelyeken feltüntetett kinetikai paraméterek mentén. A (D) panelen a tranziensek eloszlásai az RT80 és a „diszkriminátor”; az (E) panelen a TTP és a „diszkriminátor”; míg az (F) panelen a TTP és az RT80 paraméterek által meghatározott síkban láthatók. A négyféle szimbólum a kalciumtranziensek négy csoportját jelöli; (i) gyors, (ii) szimultán loose-patch mérésel megerősített gyors, (iii) lassú és (iiii) szimultán loose-patch mérésel megerősített lassú tranziensek. A jobb láthatóság érdekében a gyors és lassú jeleket a nekik megfelelő legszélső pontok összekötésével kapott sokszögekkel vettük körül. A sokszögek szerkesztésénél a loose-patch mérésel igazolt és nem igazolt csoportokat nem különítettük el egymástól.

Karbakol hatása a nucleus cochlearis dorsalis szemcsesejtjeinek aktivitására

A félautomatikus kiértékelő módszer kidolgozása után a nucleus cochlearis dorsalis szemcsesejtek kolinerg modulálhatóságát tanulmányoztuk. Az alkalmazott fluoreszcens festékekkel töltött szeletekben méretük és Ca^{2+} -tranzienseik kinetikája alapján többféle sejtípust különíthettünk el, de a jelen tanulmányban csak a DCN legkisebb sejtjeire, a szemcsesejtekre összpontosítottunk. Annak érdekében, hogy biztosan szemcsesejtekről regisztrált Ca^{2+} -tranziensek vizsgálatára kerüljön sor, csak a $8\text{ }\mu\text{m}$ -es szomaátmérőnél kisebb, kolinerg

agonista jelenlétében nagy frekvenciájú, gyors típusú Ca^{2+} -jelet produkáló sejtek tranzienseit vettük figyelembe. Ezen kritériumok alkalmazásával minden más sejtípust kizártunk a vizsgálatból. A szelektív sejtválasztás miatt ugyanakkor nem tudtuk megítélni a kolinerg stimulációra válaszoló sejtek arányát a teljes szemcsesejt-populáción belül.

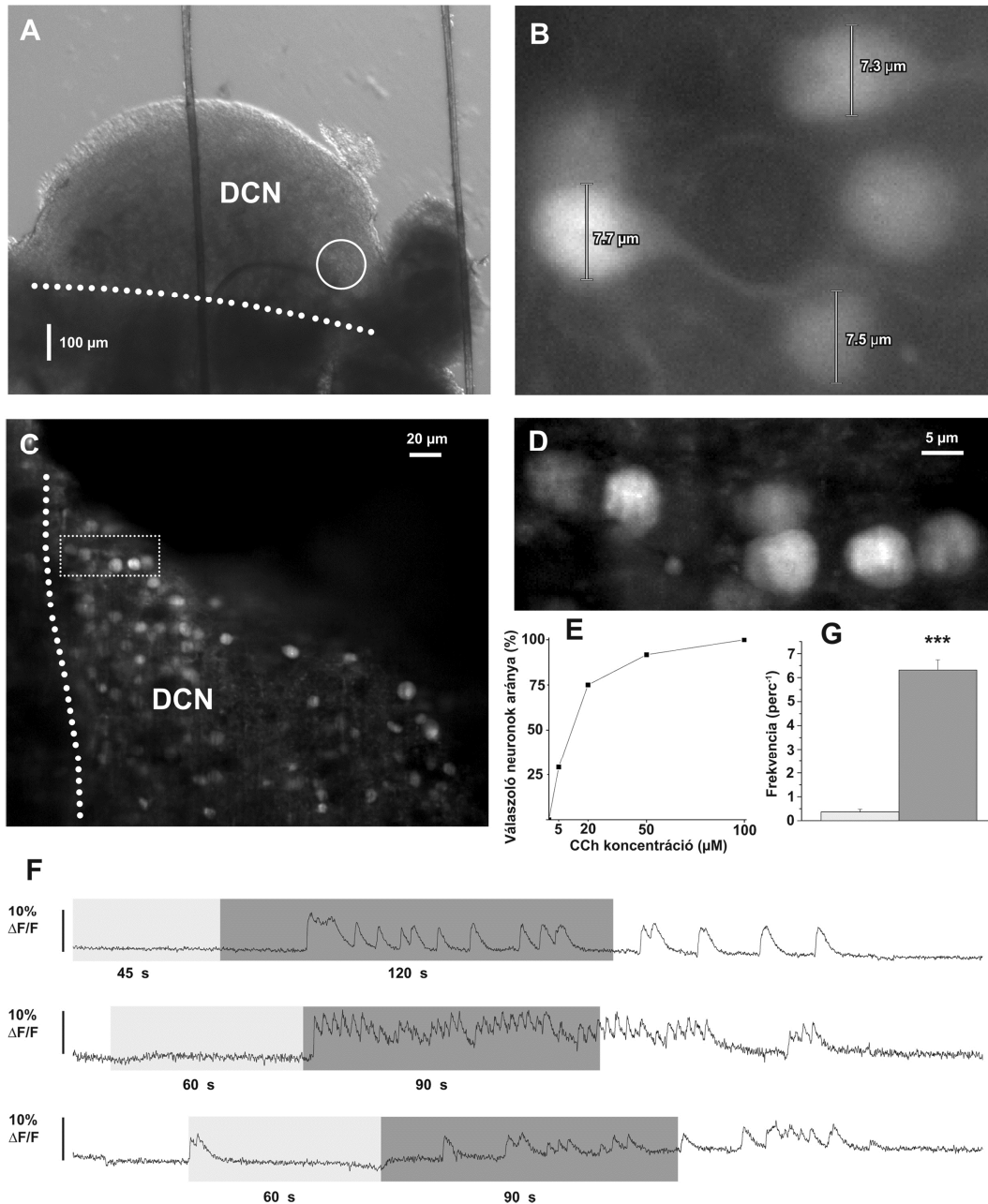
A 14A–D képek a szemcsesejtek azonosításának mikéntjét demonstrálják. A 14A ábrán egy OGB-AM-el töltött nucleus cochlearis dorsalis szelet kis nagyítású fénymikroszkópos képe, míg a 14B képen a 14A felvételen körrel jelölt terület nagy nagyítású fluoreszcens képe látható. A sejttest lokalizációja és átmérője, valamint az abból kiinduló vékony, el nem ágazó proximális nyúlványok jellegzetes lefutása alapján a 14B képen látható sejteket szemcsesejtekként azonosítottuk. Mivel a nem konfokális fluoreszcens mikroszkópos képeken a fókusz sík alatti és feletti térrészből érkező fotonok elmosódottá teszik a kontúrokat, néhány alkalommal konfokális mikroszkópiát is alkalmaztunk a szómaátmérő pontos meghatározása érdekében. Ezen vizsgálatok során először a nucleus cochlearis dorsalis egyetlen optikai szeletéről készítettünk egy kis nagyítású, különböző időpontokban rögzített x-y képsorozatot (14C ábra), majd az előzőekben kolinerg stimulációra reagáló sejtekről, nagyobb nagyítás mellett, rétegfelvétel-sorozatot csináltunk (14D ábra). A konfokális mikroszkópos kísérletekben a kolinerg aktiváció hatására aktivitásfokozódással reagáló szemcsesejtek átlagos átmérője $7,5 \pm 0,4 \mu\text{m}$ volt ($n = 9$).

Jelen munkában a kolinerg receptorok funkcionális vizsgálatához karbamil-kolint (karbakol; CCh) használtunk, de néhány kísérlet erejéig acetilkolint is alkalmaztunk. Függetlenül az alkalmazott kolinerg agonistától, a kolinerg hatás vizsgálata során először mindig a neurotranszmissziót gátló 3G-koktéllal egészítettük ki az extracelluláris oldatot. Mindig a 3G-koktél jelenlétében mért Ca^{2+} -tranziens-frekvenciát tekintettük kontrollnak, és ehhez hasonlítottuk a 3G-koktéllal kombináltan alkalmazott kolinerg szerek hatása alatt mért frekvenciaértékeket. A 3G-koktél jelenlétében a szemcsesejtek átlagos kalciumtranziens-frekvenciája $0,22 \pm 0,22 \text{ min}^{-1}$ volt, ami $100 \mu\text{mol/l}$ acetilkolin jelenlétében $8,98 \pm 1,52 \text{ min}^{-1}$ -re emelkedett (két agyszelet, $n = 6$ sejt; $p < 0,05$).

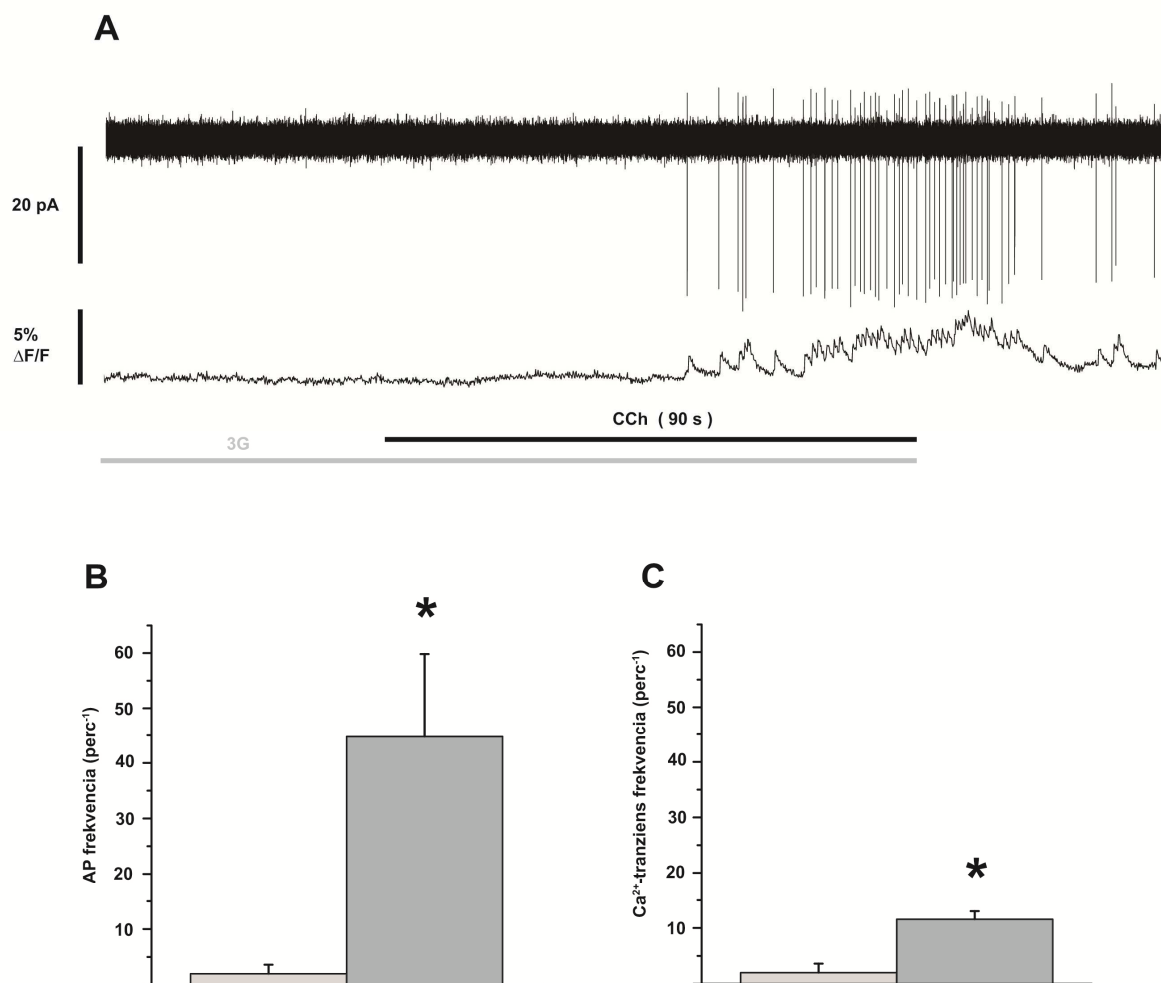
A karbakol hatásának koncentrációfüggését kumulatív módon, emelkedő koncentrációban alkalmazott agonista jelenlétében vizsgáltuk. Az egyes karbakolkoncentrációk jelenlétében aktiválódott szemcsesejtek százalékos arányát a 14E ábrán tüntettük fel (három szelet, $n = 24$ sejt). Megállapítható, hogy bár a sejtek nagy része már $20 \mu\text{mol/l}$ koncentrációjú karbakol jelenlétében aktiválódott, voltak olyan neuronok is, amik csak lényegesen nagyobb, 50 vagy $100 \mu\text{mol/l}$ koncentrációban alkalmazott karbakol hatására reagáltak aktivitásfokozódással. Annak érdekében, hogy lehetőleg minden karbakolra

érzékeny sejtet vizsgálhassunk, a további kísérleteink során mindig telítő dózisú karbakolt alkalmaztunk (100 $\mu\text{mol/l}$; 90–120 s időtartam; pl. 14F ábra). Karbakol jelenlétében 89 szemcsesejt esetében tapasztaltuk a kalciumtranziensek frekvenciájának növekedését. A megadott 89 sejt 19 patkányból preparált, 33 nucleus cochlearis szeletben helyezkedett el. A sejtek átlagos szómaátmérője $7,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$ volt. A karbakol hatására kialakuló aktivitásfokozódás statisztikailag szignifikánsnak bizonyult – a Ca^{2+} -tranziensek frekvenciája kontroll körülmények között $0,37 \pm 0,11$; karbakol jelenlétében $6,31 \pm 0,43 \text{ min}^{-1}$ volt ($p < 0,001$; 14G ábra).

Ahogy azt már érintettük, a nagy frekvenciájú AP-tüzelés során a kalciumtranziensek részleges vagy teljes összeolvadást mutattak, ami a tüzelési frekvencia szisztematikus alulbecsléséhez vezetett. Az alulbecslés mértékének becslése érdekében, öt szemcsesejt esetében, a karbakol hatásának vizsgálatát a sejtek elektromos aktivitásának és a kalciumfüggő fluoreszcenciaintenzitás változásainak egyidejű regisztrálása mellett is elvégeztük. A 15A ábra egy ilyen kísérlet eredményét mutatja, míg a 15B és C ábrákon az AP-ok és a kalciumtranziensek frekvenciájának átlagos növekedése látható, karbakol jelenlétében. A frekvencianövekedés mindkét jelenség esetében (akciós potenciál és Ca^{2+} -tranziens) szignifikáns volt, de karbakol jelenlétében – azaz jelentősen fokozott aktivitás esetében – a felismert kalciumtranziensek frekvenciája valóban jelentősen kisebbnek bizonyult, mint az AP-ok frekvenciája. Kontroll körülmények között ugyanakkor – azaz nyugalmi aktivitás mellett – a kalciumtranziensek és az akciós potenciálok frekvenciája nem tért el jelentősen egymástól.



14. ábra. KARBAKOL HATÁSA A NUCLEUS COCHLEARIS DORSALIS SZEMCSESEJTEK KALCIUMJELEIRE. (A) és (B) OGB-vel töltött szemcsesejtek elhelyezkedése az agyszeletben. (A) A DCN kis nagyítású (4× objektív) fénymikroszkópos képe. (B) Az (A) panelen körrel jelölt terület nagy nagyítású (63× objektív) fluoreszcens képe. Az (A) panelen a pontozott vonal a DCN és VCN határát jelzi. A (C) és (D) paneleken a DCN szemcsesejtjeinek konfokális mikroszkópos képei láthatók. A (C) panelen az OGB-AM-el töltött DCN szelet kisebb nagyítású (20× objektív) konfokális képe látható, a pontozott vonal a DCN-VCN határt jelöli. A (D) panel a (C) panelen bekeretezett terület nagyobb nagyítású (40× objektív) konfokális kép alapján készített rekonstrukciója. Az (E) panelen a különböző CCh-koncentrációkra reagáló szemcsesejtek százalékos aránya látható az összes sejt képest (24 sejt; 100%). Az (F) panel három reprezentatív fluoreszcens regisztrátumot demonstrál, amiket három különböző szeletben elhelyezkedő szemcsesejtről rögzítettünk. A világosszürke háttér a 3G-koktél, a sötétszürke háttér a CCh+3G koktél kombinált alkalmazásának idejét jelöli. A (G) panelen az összes CCh alkalmazására válaszoló szemcsesejt (n = 89) átlagos Ca^{2+} -transziens-frekvenciája látható, kontroll körülmények között (világosszürke oszlop) és CCh hatása alatt (sötétszürke oszlop). ***: $p < 0,001$.



15. ábra. Karbakol hatására kialakuló kalciumtransziens- és akcióspotenciál-frekvencia-növekedés. Az (A) képen egy szemcsesejt elektromos aktivitásának (felső sor) és kalciumkoncentráció-változásainak (alsó sor) egyidejű regisztrálása látható. A CCh jelenlétében mind az AP-ok, mind a gyors típusú kalciumjelek frekvenciája megnőtt. Bár látszólag minden AP-hoz tartozik kalciumjel, a nagyobb frekvenciájú AP-tüzelés alatt a kalciumtransziensek részlegesen összeolvadtak. Az egyes agonisták és antagonisták (CCh és 3G-koktél) alkalmazásának idejét vízszintes egyenesek jelölik. A (B) panel az átlagos AP-frekvenciát mutatja CCh jelenlétében és hiányában (n = 5). A (C) panel az átlagos kalciumtransziens-frekvenciát mutatja CCh jelenlétében és hiányában, ugyanazon öt sejt esetében. *: $p < 0.05$.

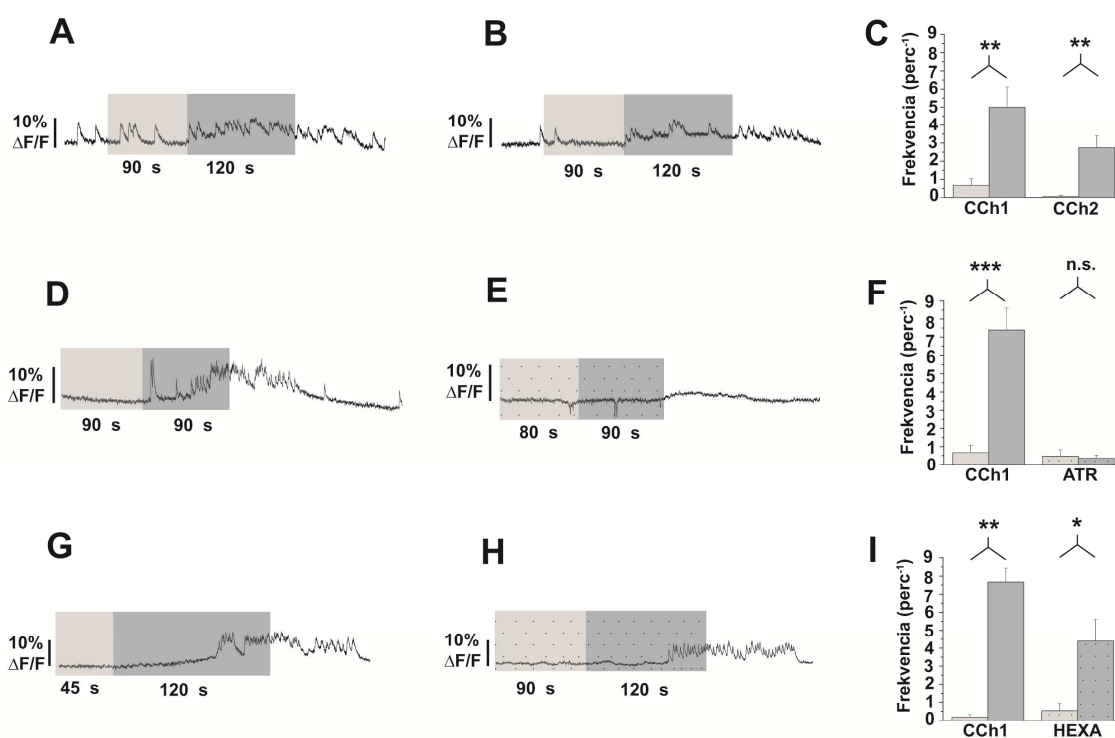
A kolinerg stimuláció hatását közvetítő receptorok azonosítása érdekében kolinerg antagonistákat is alkalmaztunk. Az ilyen kísérletek azonban szükségessé tették a karbakol ismételt alkalmazását, ezért először a karbakol hatásának ismételhetségét határoztuk meg. Ezen mérésekben azt vizsgáltuk, hogy két, egymást követő karbakolalkalmazás esetén vajon különbözik-e a kiváltott kalciumtransziensek frekvenciája. A 16A és B ábrák ugyanazon szemcsesejt válaszait mutatják előbb az első, majd kimosást követően a második karbakol alkalmazására, míg a 16C ábra az összes hasonló kísérlet összesített eredményét tünteti fel. Látható, hogy az első karbakolalkalmazás során a Ca²⁺-transziensek átlagos frekvenciája

szignifikánsan megnőtt ($0,67 \pm 0,38 \text{ min}^{-1}$ értékről $5,00 \pm 1,11 \text{ min}^{-1}$ értékre; két patkányból származó öt szelet, $n = 10$ sejt). A kimosást (8–10 perc) követően alkalmazott, megismételt karbakolexpozíció során a tranziensek frekvenciája újra szignifikáns növekedést mutatott ($0,07 \pm 0,06 \text{ min}^{-1}$ értékről $2,74 \pm 0,67 \text{ min}^{-1}$ értékre). A számokból az is nyilvánvalóvá vált ugyanakkor, hogy a második karbakolalkalmazás során csökkent a szemcses sejtek kolinerg stimuláció iránti érzékenysége. Ezt a jelenséget a továbbiakban tachyphylaxis néven említjük.

A következő lépésben azt vizsgáltuk, hogy a kolinerg stimuláció kivédhető-e a muszkarinos kolinerg receptorok általános antagonistájával, az atropinnal. Ezen kísérletekben (két állatból származó négy szelet, $n = 17$ sejt) az eddigiekhez hasonlóan először 3G-koktétlt alkalmaztunk, majd azt kiegészítettük $100 \mu\text{mol/l}$ koncentrációjú karbakollal (16D ábra). Kimosást követően (8–10 perc) a 3G-koktétlt $50 \mu\text{mol/l}$ atropinnal kombináltuk, majd a 3G-koktétlt, karbakolt és atropint egyszerre alkalmaztuk (16E ábra). A 16F ábra az összes hasonló körülmények között végzett kísérlet eredményét összegzi. A Ca^{2+} -tranziensek frekvenciája az első karbakolalkalmazás alatt szignifikánsan nőtt ($0,67 \pm 0,41 \text{ min}^{-1}$ -ről $7,39 \pm 1,22 \text{ min}^{-1}$ -re), míg atropin és karbakol együttes alkalmazásának hatására nem változott szignifikánsan a tranziensek frekvenciája. Az atropin és karbakol egyidejű jelenlétében regisztrált kalciumtranziens-frekvenciát (16F ábra, 4. oszlop) a tachyphylaxis vizsgálata során tapasztalt kalciumtranziens-frekvenciával (16C ábra, 4. oszlop) összehasonlítva statisztikailag szignifikáns különbséget kapunk ($p < 0,01$). A megfigyelés arra utalt, hogy az atropin jelenlétében kapott frekvenciacsökkenés mértéke szignifikánsan nagyobb volt annál, mint ami pusztán a tachyphylaxis jelensége miatt várható. Ez az eredmény azt jelzi, hogy a muszkarinos kolinerg receptorok meghatározó jelentőségűek a kolinerg hatás kialakulásában.

A következő lépésben, hexamethonium alkalmazásával, a nikotinos receptorok szerepét vizsgáltuk a karbakol hatásának kialakításában. Az eddigiekhez hasonlóan, ezekben a kísérletekben (két állatból származó hat szelet, $n = 15$ sejt) először 3G-koktétlt alkalmaztunk, amit a következő lépésben $100 \mu\text{mol/l}$ koncentrációjú karbakollal egészítettünk ki (16G ábra). Kimosás után (8–10 perc) először a 3G-koktétlt és $100 \mu\text{mol/l}$ koncentrációjú hexamethoniumot alkalmaztuk, majd az antagonista folyamatos jelenlétében karbakollal egészítettük ki az extracellularis oldatot (16H ábra). A 16I ábra valamennyi ilyen kísérlet eredményének összefoglalását demonstrálja. Megfigyelhető, hogy az első karbakolexpozíció hatására szignifikánsan nőtt a tranziensek frekvenciája ($0,18 \pm 0,14 \text{ min}^{-1}$ -ről $7,54 \pm 0,81 \text{ min}^{-1}$ -re). Hexamethonium jelenlétében a tranziensek frekvenciája kisebb mértékben bár, de ugyancsak szignifikánsan fokozódott ($0,53 \pm 0,40 \text{ min}^{-1}$ -ről $4,4 \pm 1,2 \text{ perc}^{-1}$ -re). A hexamethonium és karbakol együttes jelenlétében regisztrált

kalciumtranziens-frekvenciát (16I ábra, 4. oszlop) a tachyphylaxis vizsgálata során tapasztalt kalciumtranziens-frekvenciával összehasonlítva statisztikailag szignifikáns különbség nem volt igazolható. Más szavakkal, a hexamethonium jelenlétében a Ca^{2+} -tranziensek frekvenciája nem csökkent a tachyphylaxis jelensége alapján várhatónál nagyobb mértékben. Ezen eredmény alapján megalapozottan jelenthető ki, hogy a nikotinos receptoroknak nincs érdemi jelentősége a szemcsesejteken karkabol hatására kialakuló aktivitásfokozódás kialakításában.



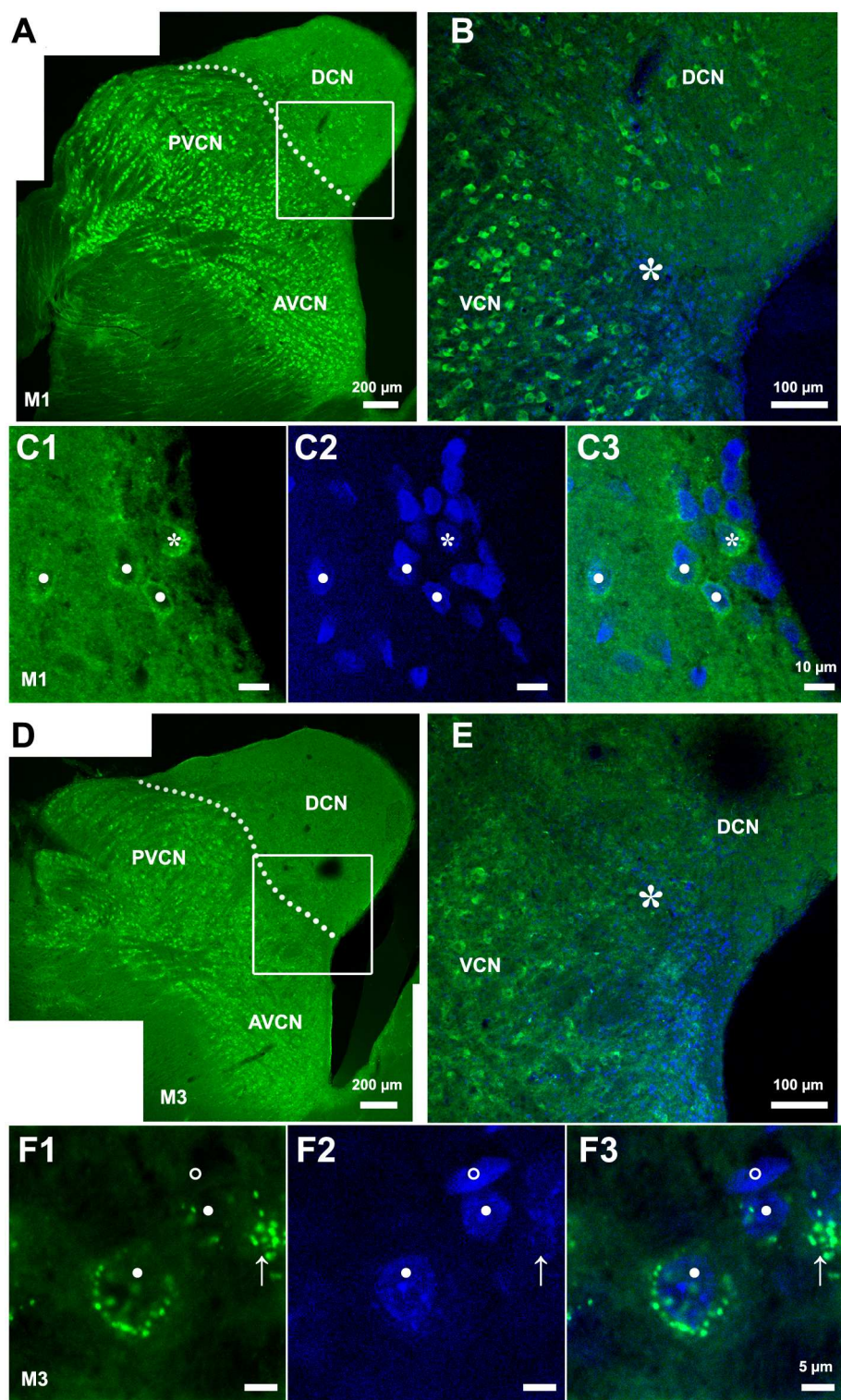
16. ábra. Atropin és hexamethonium hatása a szemcsesejtek karkabol által kiváltott kalciumjeleire. (A–B) Egy szemcsesejt kalciumkoncentráció-változásait tükröző fluoreszcenciaregisztrátumok. A világosszürke háttér a 3G-kotél alkalmazásának idejét, a sötétszürke háttér a CCh és a 3G-kotél együttes alkalmazásának idejét jelöli. Az (A) panel az első, a (B) panel a kimosást követő második CCh alkalmazást mutatja. A (C) panel az ismételt CCh alkalmazás vizsgálatához tartozó összes kísérlet eredményét foglalja össze ($n = 10$). Az oszlopok az átlagos kalciumtranziens-frekvenciát jelölik. A világosszürke oszlopok a 3G-kotél, a sötétszürke oszlopok a CCh és a 3G-kotél együttes alkalmazásakor mért kalciumtranziens-frekvencia átlagát mutatják. (D) Egy szemcsesejt aktivitása 3G-kotél alkalmazásakor (világosszürke háttér) és CCh+3G-kotél jelenlétében (sötétszürke háttér). Az (E) panelen ugyanazon sejt aktivitása látható, ezúttal a kimosást követő atropinalkalmazás során. A világosszürke pontozott háttér az atropin+3G-kotél; a sötétszürke pontozott háttér pedig az atropin+CCh+3G-kotél egyidejű alkalmazását jelöli. Az (F) panelen az atropinhatás vizsgálatához tartozó kísérletek összefoglalása látható ($n = 17$). A világosszürke oszlopok a 3G-kotél, a sötétszürke oszlopok a CCh+3G-kotél együttes alkalmazásakor mért kalciumtranziens-frekvencia átlagát mutatják (bal oldal, CCh1). A világosszürke pontozott oszlopok az atropin+3G-kotél, a sötétszürke pontozott oszlopok pedig az atropin+CCh+3G-kotél együttes alkalmazásakor mért kalciumtranziens-frekvencia átlagát mutatják (jobb oldal, ATR). (G) Egy szemcsesejt aktivitása 3G-kotél alkalmazásakor (világosszürke háttér) és CCh+3G-kotél

jelenlétében (sötétszürke háttér). A **(H)** panelen ugyanazon sejt aktivitása látható, ezúttal a kimosást követő hexamethoniumalkalmazás során. A világosszürke pontozott háttér a hexamethonium+3G-koktél; a sötétszürke pontozott háttér pedig a hexamethonium+CCh+3G-koktél egyidejű alkalmazását jelöli. Az **(I)** panelen a hexamethonium hatás vizsgálatához tartozó kísérletek összefoglalása látható ($n = 15$). A világosszürke oszlopok a 3G-koktél, a sötétszürke oszlopok pedig a CCh+3G-koktél együttes alkalmazásakor mért kalciumtranziens-frekvencia átlagát mutatják (bal oldal, CCh1). A világosszürke pontozott oszlopok hexamethonium+3G-koktél, a sötétszürke pontozott oszlopok pedig a hexamethonium+CCh+3G-koktél együttes alkalmazásakor mért kalciumtranziens-frekvencia átlagát mutatják (jobb oldal, HEXA). n.s.: nem szignifikáns; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

M1- és M3-típusú muszkarinos receptorok szerepe a kolinerg hatás közvetítésében

Az szemcsesejtek kolinerg modulációját célzó eddigi eredmények rámutattak arra, hogy a nucleus cochlearis dorsalis szemcsesejtjeinek aktivitása kolinerg stimuláció hatására fokozódik, és ezen hatás döntően muszkarinos receptorokon keresztül valósul meg. A muszkarinos receptorok aktivációjának következményeként kialakuló tónusos depolarizációt, és az ehhez társuló megnövekedett ingerlékenységet agykérgi, gerincvelői és primer vestibularis afferens neuronoknál, valamint szimpatikus ganglionok sejtjeinél is leírták, ahol a jelenség hátterében az úgynevezett „M-áram” áll (Krnjevic és Mtsai., 1971; Nowak és Macdonald, 1983; Pérez és mtsai., 2010; Weight és Votava, 1970; Brown és Adams; 1980). Az M-áram modulációjáért G_q -fehérjéhez kapcsolt receptorok felelősek (Delmas és Brown, 2005; Pérez és mtsai, 2010); a muszkarinos kolinerg receptorok esetében ezek az M1-, M3- és M5-típusba sorolható receptorfehérjék. Munkacsoportunk már korábban leírta, hogy 8–10 napos patkányok nucleus cochlearis dorsálisában az M5-receptorokra specifikus RNS elenyésző, míg az M1- és az M3-receptorspecifikus RNS jelentős mennyiségben van jelen (Pál és mtsai, 2009). Ugyanebben a tanulmányban arra is rávilágítottunk, hogy az M3-receptor RNS-e mintegy négyszer akkora mennyiségben van jelen, mint az M1-receptoré.

Ezen előzetes adatokból kiindulva az M5-receptorok szerepét a jelen munkában nem vizsgáltuk. Az M1- és M3-receptorok lehetséges szerepének feltárása érdekében először konfokális mikroszkópiával kombinált immunjelölést végeztünk. A kísérleteket a receptorok expresszióját esetlegesen érintő életkorfüggő változások megítélése végett mind 15, mind 30 napos patkányokon elvégeztük. Mivel az eltérő korú állatok muszkarinreceptor-expressziójában érdemi különbséget nem találtunk, csak a 30 napos állatokon kapott eredményeket mutatjuk be (17. ábra).



17. ábra. M1- és M3-típusú muszkarinreceptor-specifikus immunjelölés a nucleus cochlearisban. (A) Kis nagyítású, konfokális mikroszkópos kép a nucleus cochlearis M1-receptorspecifikus immunjelöléséről. A pontozott vonal a nucleus cochlearis ventralis és dorsalis közötti határt jelöli. A (B) panel nagyobb nagyítással mutatja az (A) képen négyzettel jelölt területet. A csillag a DCN és VCN határán lévő szemcsesejtes réteg egy részét jelöli, ahol jól megítélhetők a sűrűn elhelyezkedő, DAPI-val jelölt sejtmagok. (C1–C3) Nagy nagyítású konfokális képek a (B) felvétlen csillaggal jelölt szemcsesejtes régióról. A (C1) panelen zöld szín jelöli az M1-specifikus immunjelölődést, a (C2) panelen DAPI-val jelölt, kék színű sejtmagok láthatók, a (C3) panel pedig az előző két felvétel egymásra vetítése. A fehér pontok néhány erős M1-jelölődést mutató szemcsesejtet jelölnek. A csillag egy olyan szemcsesejtet

jelöl, ahol szembevetendő az M1-specifikus jelölődés szemcsés jellege. **(D)** Kis nagyítású, konfokális mikroszkópos kép a nucleus cochlearis M3-receptorspecifikus immunjelöléséről. A pontozott vonal a dorsalis és a ventralis magrészt közöti határt jelöli. Az **(E)** panel nagyobb nagyítással mutatja a **(D)** panelen négyzettel jelölt területet. A csillag a DCN és VCN határán lévő szemcsesejtes réteg egy részét jelöli. **(F1–F3)** Nagy nagyítású konfokális képek az **(E)** panelen csillaggal jelölt szemcsesejtes régióról. Az **(F1)** panelen zöld szín jelöli az M3-specifikus immunjelölődést, az **(F2)** panelen DAPI-val jelölt, kék színű sejtmagok láthatók, az **(F3)** panel pedig az előző két felvétel egymásra vetítése. A fehér pontok erős M3-specifikus jelölődést mutató szemcsesejtekre hívják fel a figyelmet. A jelölődés szemcsézett jellege minden esetben szembeötlő, a nyíllal jelölt sejt esetében a szemcsék a sejtfelszínen mutatkoznak. Az üres karikával jelölt sejt eltérő alakú, megnyúlt sejtmaggal rendelkezik, és nem mutat M3-specifikus immunpozitivitást.

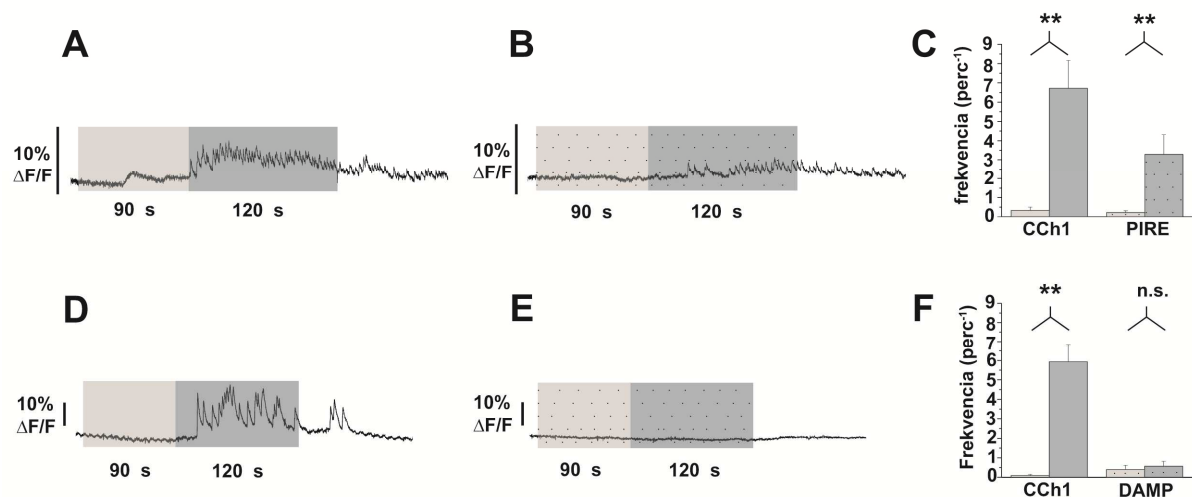
Mind a nucleus cochlearis ventralisban, mind a nucleus cochlearis dorsalisban kimutathatóak voltak M1- és M3-receptorspecifikus immunjelölődést mutató sejtek (17A és D ábrák). A pozitívan jelölődött sejtek méretük, morfológiájuk és elhelyezkedésük alapján többféle sejtípushoz tartoztak, ám jelen munka keretében csak a szemcsesejtek jelölődését vizsgáltuk. Ennek érdekében megkülönböztetett figyelmet szenteltünk a ventralis és dorsalis magrészt elválasztó területnek, ahol a szemcsesejtek egy övszerű réteget alkotva igen nagy számban fordulnak elő (17B és E ábrák). A nucleus cochlearis ventralist és dorsalist elválasztó szemcsesejtes réteg mindig könnyen azonosítható volt lokalizációja, és a benne sűrűn elhelyezkedő, kisméretű sejtmagok alapján. Az immunjelölés megoszlása alapján egyértelmű volt, hogy a nucleus cochlearis szemcsesejtjei expresszálják az M1-típusú receptort (17C1–C3 ábra). A jelölődés a sejtfelszíni membránban volt a legintenzívebb; egyes esetekben kifejezetten foltoszerű, olykor szemcsézett jeleget mutatott (lásd például a csillaggal jelölt sejtet a 17C1–C3 ábrákon). A jelölődés ilyen megjelenése a sejtfelszíni membránban valószínű receptoraggregációra utal. A szemcsesejtek M3-receptor immunpozitivitását ugyancsak kimutattuk (17F1–F3 ábra), és ebben az esetben még kifejezettebb volt a jelölődés szemcsézett megoszlása a sejtfelszíni membránban. Érdekes rámutatni, hogy M3-negatív sejtek is láthatóak voltak a szeletben (lásd például a körrel jelölt sejtet a 17F ábrán). Ezek a sejtek belső negatív kontrollként szolgáltak, és megerősítették az alkalmazott immunjelölés specifikus voltát.

Miután az immunhisztokémiai kísérletek igazolták az M1- és az M3-receptorok jelenlétét a szemcsesejteken, ezen receptorok funkcionális jelentőségét is vizsgálat alá vettük. A mérések során receptoraltípus-specifikus gátlószereket alkalmaztunk, és arra kerestünk választ, hogy vajon hogyan érinti egyik vagy másik receptorféleség gátlása a nucleus cochlearis szemcsesejtjeinek karbakol hatására kialakuló aktivitásfokozódását.

Az M1-receptorok jelentőségének vizsgálatát egy M1-specifikus antagonistá, a pirenzepin alkalmazásával tanulmányoztuk. Az eddigiekhez hasonlóan, ezekben a

kísérletekben (három állatból származó négy szelet, $n = 12$ sejt) is először 3G-koktétlt, majd $100 \mu\text{mol/l}$ koncentrációjú karbakolt és 3G-koktétlt együttesen alkalmaztunk (18A ábra). Kimosást követően először ismét a 3G-koktétl következett, immár $1 \mu\text{mol/l}$ koncentrációjú pirenzepin jelenlétében, majd karbakol, pirenzepin és 3G-koktétl egyidejű alkalmazására került sort (18B ábra). A 18C ábra valamennyi hasonló módon kivitelezett kísérlet eredményét összegzi. Megállapítható, hogy a karbakol első alkalmazása során szignifikánsan nőtt a Ca^{2+} -tranziensek frekvenciája ($0,33 \pm 0,17 \text{ min}^{-1}$ -ről $6,72 \pm 1,44 \text{ min}^{-1}$ -re). Pirenzepin egyidejű jelenlétében a tranziensek frekvenciája kisebb mértékben ugyan, de még mindig szignifikánsan fokozódott ($0,22 \pm 0,10 \text{ min}^{-1}$ -ről $3,29 \pm 1,02 \text{ min}^{-1}$ -re). Nem találtunk viszont statisztikailag igazolható különbséget, amikor a pirenzepin és a karbakol együttes jelenlétében regisztrált kalciumtranziens-frekvenciát (18C ábra, 4. oszlop) a tachyphylaxis vizsgálata során tapasztalt értékkel vetettük össze. Ez a megfigyelés arra utalt, hogy a pirenzepin jelenlétében a frekvencia körülbelül olyan mértékben csökkent, mint ami a tachyphylaxis jelensége alapján várható. Ebből következően, jóllehet az M1-receptorok jelen vannak a szemcsesejtekben, a kolinerg stimuláció közvetítésében betöltött szerepük elhanyagolható.

Végezetül az M3-specifikus antagonistá hatású 4-DAMP jelenlétében vizsgáltuk az M3-típusú receptorok szerepét a kolinerg stimuláció kialakításában. Ezen kísérletekben (három állatból származó öt szelet, $n = 15$ sejt) az eddig ismertetett sorrendben és kombinációban alkalmaztuk a különböző farmakonokat (18D és E ábrák). A 18F ábra valamennyi hasonló kísérlet eredményének összegzése. Az karbakol első alkalmazásakor a Ca^{2+} -tranziensek frekvenciája szignifikánsan nőtt ($0,09 \pm 0,06 \text{ min}^{-1}$ -ről $5,93 \pm 0,91 \text{ min}^{-1}$ -re); 4-DAMP és karbakol együttes alkalmazása során ugyanakkor a tranziensek frekvenciája nem változott szignifikáns mértékben ($0,40 \pm 0,21 \text{ min}^{-1}$ -ről $0,57 \pm 0,25 \text{ min}^{-1}$ -re). Amikor a 4-DAMP és karbakol együttes jelenlétében regisztrált kalciumtranziensek frekvenciáját (18F ábra, 4. oszlop) a tachyphylaxis vizsgálata során tapasztalt értékkel vetettük össze, a különbség statisztikailag szignifikánsnak bizonyult ($p < 0,01$). Ez a megfigyelés azt jelzi, hogy 4-DAMP jelenlétében a Ca^{2+} -tranziensek frekvenciája sokkal kifejezettebben csökkent, mint az a tachyphylaxis jelenségéből önmagában következne; azaz az M3-típusú muszkarinos receptorok értékelhető szerepet játszanak a szemcsesejteket érintő kolinerg hatás kialakulásában.



18. ábra. Altípusos muszkarinreceptor-antagonisták hatása a nucleus cochlearis dorsalis szemcsesejtek karbakol által kiváltott kalciumjeleire. (A) Egy szemcsesejt aktivitása 3G-koktél alkalmazásakor (világosszürke háttér), valamint CCh+3G-koktél jelenlétében (sötétszürke háttér). (B) panelen ugyanazon sejt aktivitása látható, ezúttal a kimosást követő pirenzepinalkalmazás során. A világosszürke pontozott háttér a pirenzepin+3G-koktél; a sötétszürke pontozott háttér pedig a pirenzepin+CCh+3G-koktél egyidejű alkalmazását jelöli. A (C) panelen a pirenzepin hatásának vizsgálatához tartozó kísérletek összefoglalása látható ($n = 12$). A világosszürke oszlopok a 3G-koktél, a sötétszürke oszlopok pedig a CCh+3G-koktél együttes alkalmazásakor mért kalciumtranziens-frekvencia átlagát mutatják (bal oldal, CCh1). A világosszürke pontozott oszlopok a pirenzepin+3G-koktél, a sötétszürke pontozott oszlopok pedig a pirenzepin+CCh+3G-koktél együttes alkalmazásakor mért kalciumtranziens-frekvencia átlagát mutatják (jobb oldal, PIRE). (D) Egy szemcsesejt aktivitása 3G-koktél alkalmazásakor (világosszürke háttér), valamint CCh+3G-koktél jelenlétében (sötétszürke háttér). Az (E) panelen ugyanazon sejt aktivitása látható, ezúttal a kimosást követő 4-DAMP-alkalmazás során. A világosszürke pontozott háttér pontokkal a 4-DAMP+3G-koktél; a sötétszürke pontozott háttér pedig a 4-DAMP+CCh+3G-koktél egyidejű alkalmazását jelöli. Az (F) panelen a 4-DAMP hatás vizsgálatához tartozó kísérletek összefoglalása látható ($n = 15$). A világosszürke oszlopok a 3G-koktél, a sötétszürke oszlopok a CCh+3G-koktél együttes alkalmazásakor mért kalciumtranziens-frekvencia átlagát mutatják (bal oldal, CCh1). A világosszürke pontozott oszlopok a 4-DAMP+3G-koktél, a sötétszürke pontozott oszlopok pedig a 4-DAMP+CCh+3G-koktél együttes alkalmazásakor mért kalciumtranziens-frekvencia átlagát mutatják (jobb oldal, DAMP). n.s.: nem szignifikáns; **: $p < 0,01$.

Megbeszélés

A nucleus cochlearis dorsalis Purkinje-szerű sejtjei vonatkozásában leírt új adatok, és azok jelentősége

Jelen munka első részében a DCN Purkinje-szerű sejtjeit vizsgáltuk. Részletes leírást adtunk ezen sejtípus morfológiai jegyeiről; kimutattuk, hogy kellően nagy amplitúdójú, depolarizáló áraminjekcióra fenntartott AP-tüzeléssel reagálnak; és demonstráltuk, hogy rendelkeznek egy hiperpolarizációra lassú aktivációt mutató, befelé irányuló árammal, amit h-áramként azonosítottunk. Munkánk során az irodalomban első ízben regisztráltunk a PLC-k sejttestéről elvezethető, spontán posztszinaptikus áramokat, amik bizonyítékát adják annak, hogy ez a sejtípus aktív részét képezi a nucleus cochlearis működését biztosító neuronhálózatnak. Immunhisztokémiai kísérletekben kimutattuk, hogy a PLC-k expresszálják a GABA bioszintézisért felelős glutamát-dekarboxiláz enzimet, így megalapozottan feltételezhető, hogy GABAerg sejtekről van szó.

A PLC-k morfológiájának leírására, már korábban is történtek próbálkozások, jórészt klasszikus szövettani módszerek alkalmazásával (Hurd és Feldman, 1994; Spatz, 1997; Spatz, 2003). Jelen munkánk újszerűsége abban áll, hogy fluoreszcens jelölés és konfokális mikroszkópia kombinált alkalmazásával az eddigieknél pontosabban megítélhetővé vált a PLC-k térben elfoglalt helyzete és szerkezete. A sejttest legnagyobb átmérőjét jelen tanulmányunkban átlagosan 28 μm -nek találtuk, ami hasonló a a Hurd és Feldman (1994) által megadott értékhez (25,5 μm). Jelen tanulmányunk is meggyőzően demonstrálta, hogy a PLC-k dendritfája igen bonyolult szerkezetű. Az elágazások nagy száma miatt a dendritfa sűrűn beborítja a sejt környezetét, így az eredő dendritek számának pontos meghatározása „klasszikus” szövettani metszetben igen nehéz feladat. A tanulmányunkban alkalmazott megközelítés azonban – azaz konfokális mikroszkópia és az egyedi optikai szeletekből rekonstruált háromdimenziós képek vizsgálata – lehetővé tette a PLC-k morfológiáját jellemző ezen paraméter meghatározását is. Eredményeink szerint az eredő dendritek száma átlagosan 11, így a PLC-k jelentősen különböznek a kifejlett egyedek Purkinje-sejteitől, amik egyetlen eredő dendrittel rendelkeznek (McKay és Turner, 2005). Bár az egyedfejlődés korai szakaszában a kisagy Purkinje-sejtek is több nyúlvánnyal bírnak, a kúszórost-rendszer fejlődésével párhuzamosan az egy kúszórost által beidegzett dendritfa erőteljes fejlődésnek indul, míg a többi elsorvad, majd eltűnik (Bosman és mtsai., 2008, Watanabe és Kano, 2011).

Nyúlványrendszerük térbeli elhelyezkedése alapján a subependymalisan elhelyezkedő PLC-k két csoportját különböztettük meg, a kolumnáris (centripetális) és a legyezőszerű

dendritfával jellemezhető sejteket. Az előbbi csoport eredő dendritjei szinte kizárólag a mag mély rétegei felé irányulnak, míg az utóbbi csoportban az eredő dendritek egy számottevő része a mag felszínével párhuzamos irányban indul, és csak a distalisabb dendritszakaszok haladnak a mag középpontja felé. Érdekes rámutatni, hogy a kisagyi Purkinje-sejteknel a dendritfa irányultsága ezzel ellentétes, azaz a Purkinje-sejtek rétegéhez képest centrifugálisan, a kisagykéreg felszíne felé mutat. A PLC-k mindkét altípusának dendritfája lényegesen nagyobb volt sagittalis, mint transversalis síkban. A sagittalis síkban mérve, a legyezőszerű PLC-k átlagosan $7000\ \mu\text{m}^2$, míg a centripetális PLC-k átlagosan $8700\ \mu\text{m}^2$ -es dendritfafelülettel rendelkeztek; ugyanakkor a transversalis síkban meghatározható kiterjedésük mindkét alcsoport esetén jóval kisebb volt – az 1L ábrán bemutatott sejt esetén például mindössze $30\ \mu\text{m}$. A kisagyi Purkinje-sejtek dendritfája a sagittalis síkban mintegy $17000\text{--}20000\ \mu\text{m}^2$ felületet borít be, a dendritfa vastagsága a transversalis síkban mérve pedig $20\ \mu\text{m}$ körüli (Kaneko és mtsai., 2011). A kisagyi Purkinje-sejtek dendritfája egyébként egy legyezőként képzelhető el, ahol a nyúlványszakaszok egyetlen síkban helyezkednek el (Kaneko és mtsai., 2011). Ez a dendritmorfológia a kisagykéreg cytoarchitectúrájának fontos eleme.

Más tanulmányok eredményeivel összhangban (pl. Spatz, 1997) a jelen kísérletsorozat is megerősítette, hogy a PLC-k – a kisagyi Purkinje-sejtekhez hasonlóan – igen erős calbindinexpressziót mutatnak. A calbindin mind a sejttestben, mind a dendritekben jelen van. Ebből következően a calbindin-specifikus immunjelölés kiválóan alkalmas a PLC-k jelölésére, ami egyebek között módot adott ezen sejttípus dendritikus struktúrájának pontos jellemzésére.

A cerebellint először Purkinje-sejt-specifikus fehérjeként írták le (Slemmon és mtsai., 1985; Slemmon és mtsai., 1988), majd jelenlétét a DCN cartwheel-sejtjeiben és a subependymalisan elhelyezkedő, akkor még „ectopiás Purkinje-sejtjek”-ként azonosított struktúrákban is kimutatták (Mugnaini és Morgan, 1987). Ezzel összhangban a jelen kísérleteinkben is dokumentáltuk a kisagyi Purkinje-sejtek, a PLC-k és a cartwheel-sejtek cerebellin pozitivitását; ugyanakkor a jelölődési mintázat jelentős mértékben eltért az egyes sejttípusok esetében. A kisagyi Purkinje-sejtek sejtteste és dendritjei egyaránt mutattak cerebellin-specifikus jelölődést, míg a PLC-k és a cartwheel-sejtek esetében a cerebellin-pozitivitás a sejttestre korlátozódott. Léteznek olyan vélemények, miszerint a cerebellint a kisagyi szemcsesejtek termelik és szabadítják fel az axonvégződéseikből, ahonnan eddig nem tisztázott módon kerül be a Purkinje-sejtekbe. A feltételezések szerint ezen folyamat nélkülözhetetlen szerepet tölt be a kisagyi paralellrost–Purkinje-sejt szinapszisok

fennmaradásában és plaszticitásában (Hirai és mtsai., 2005; Yuzaki, 2008). Elképzelhető, hogy a PLC-k maguk expresszálják a cerebellint; de az sem kizárható, hogy ezt a fehérjét a DCN más neuronjai termelik, ami aztán transzszinaptikus úton halmozódik fel a PLC-kben. A jelen munkában azt figyeltük meg, hogy a PLC-k cerebellin-specifikus jelölése szinte kizárólag a sejtestre szorítkozik, és azon belül is elsősorban a perinuclearis területre jellemző. Ez a megfigyelés a PLC-ken belüli *de novo* cerebellinszintézist látszik támogatni, hiszen a perinuclearis jelölődés az endoplasmaticus reticulumnak, és a frissen szintetizált (esetleg „exportra szánt”) cerebellinnek felelhet meg. A kisagyban feltételezett elrendezéshez hasonlóan elképzelhető, hogy a DCN-ben a glutamaterg szemcsesek sejtek termelik a cerebellint, amit aztán glutamaterg szinapszisokon keresztül „adnak át” a GABAerg PLC-knek. Ezen utóbbi felvetés mellett szól a DCN molekuláris rétegének erőteljes cerebellin-specifikus immunpozitivitása, valamint az, hogy a PLC-kről akkor is elvezethetők voltak serkentő hatású posztzinaptikus áramok, amikor a mag mélyebb rétegeit leválasztottuk, azaz csak a molekuláris réteg felől kaphattak szinaptikus bemeneteket. Az utóbbi kísérleti elrendezés arra utal, hogy a serkentő posztzinaptikus áramok forrása a DCN legfelületesebb rétegeiben helyezkedik el, ahol a legnagyobb sűrűségben előforduló serkentő sejtípus a cochlearis szemcsesejt. A fentiek alapján valószínűsíthető, hogy a szemcsesek sejtek szinaptikus kapcsolatokat létesítenek a PLC-kkel, azaz léteznek olyan szemcsesejt-PLC kapcsolatok, amiken keresztül a cerebellin átjuthat a PLC-kbe.

Eredményeink alapján az is megállapítható, hogy a PLC-k bizonyos funkcionális sajátosságai is hasonlóak a kisgyi Purkinje-sejtekéhez. Ezek között megemlíthető, hogy mindkét sejtípus folyamatos AP-tüzeléssel reagál a kellően erős depolarizáló impulzusra, rendelkeznek a hiperpolarizáció hatására aktiválódó nem-specifikus kationárammal (I_h), és nagy számú spontán, gátló hatású posztzinaptikus áram vezethető el róluk (Konnerth és mtsai., 1990; Williams és mtsai., 2002; Nolan és mtsai., 2003). A Purkinje-szerű sejtekről elvezetett gátló hatású posztzinaptikus áramok részben glicinergnek, részben GABAergnek bizonyultak. Az általunk alkalmazott kísérleti elrendezés természetéből fakadóan ezen IPSC-k forrása biztosan a DCN szeleten belül helyezkedett el, ami felveti annak lehetőségét, hogy részben a DCN legfontosabb gátló interneuronjai, azaz a cartwheel-sejtek felelősek ezen posztzinaptikus áramokért. Érdekes, és a mai napig nem pontosan tisztázott ellentmondás, hogy egyes szerzők annak ellenére glicinerg neuronnak tartják a cartwheel-sejteket, hogy azok igen erős GAD-pozitivást mutatnak (Golding és Oertel, 1997). A funkcionális adatok mellett szinaptofizin-specifikus immunjelöléssel is valószínűsítettük, hogy a PLC-k sejtestén és dendritjein nagy számban végződnek szinaptikus terminálisok. Figyelembe véve, hogy a

PLC-ket egyes szerzők „eltévedt Purkinje-sejt”-ként említik (Mugnaini és Morgan, 1987), igen fontos eredmény, hogy funkcionális és morfológiai bizonyítékot is találtunk arra, hogy ezen sejtek akítv részét képezik a DCN neuronhálózatának. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a PLC-k tényleges funkcióval rendelkeznek a nucleus cochlearison belül, és nem csak „véletlenül” találhatók ebben a struktúrában.

Korábbi tanulmányok már beszámoltak a közvetlenül a nucleus cochlearis dorsalis ependymalis felszíne alatt elhelyezkedő, nagy méretű GABAerg sejtestek jelenlétéről (Mugnaini, 1985). Jelen munkánkban a glutamát-dekarboxiláz- és calbindin-specifikus kettős immunjelöléssel egyértelműen megerősítettük azt a feltételezést, hogy a Mugnaini által leírt sejtféleség a PLC-vel azonos. Érdekes rámutatni, hogy a GABAerg jelleg egy újabb lényeges hasonlóság a kisagyi Purkinje-sejtek és a PLC-k között.

Mindent összevetve, bár a kisagyi Purkinje-sejtek és a nucleus cochlearis Purkinje-szerű sejtszelei között több jelentős morfológiai és funkcionális hasonlóság és különbség is feltárható, ezek alapján sem megerősíteni, sem cáfolni nem lehet a két sejtípus esetleges közös eredetét sugalló teóriákat. Ennek ellenére a jelen kísérletsorozat által szolgáltatott új adatok támpontot biztosíthatnak a PLC-k nucleus cochlearison belül betöltött funkciójának meghatározásához. Úgy véljük, hogy a PLC-kkel kapcsolatos jövőbeli kutatásoknak részletesen vizsgálnia kellene ezen sejtek szinaptikus kapcsolatait, hogy ezáltal pontosan elhelyezhetőek legyenek a nucleus cochlearis neuronhálózatában, és pontosabban meghatározható legyen a hallás központi idegrendszeri folyamataiban betöltött funkciójuk.

A nucleus cochlearis dorsalis szemcsesejtjeihez kapcsolódó új eredmények, és azok jelentősége

Jelen munka második részében a DCN sejtjeinek kalciumkoncentráció-változásait vizsgáltuk. A kísérletek kapcsán kifejlesztettünk egy olyan számítógépes programot, ami lehetővé teszi a kalciumtranziensek felismerését és azok kinetikai paramétereinek leírását. Részletesen jellemeztük a szemcsesejtek gyors kalciumjeleinek időbeli lefutását, és bizonyítottuk azok AP-kapcsolt voltát. Kimutattuk, hogy kolinerg stimuláció szignifikánsan növeli a szemcsesejtek gyors kalciumjeleinek frekvenciáját – még a DCN neuronhálózatának farmakológiai szétkapcsolása mellett is. Rámutattunk, hogy a megfigyelt hatások atropin alkalmazásával teljes egészében kivédhetők. Végezetül bizonyítottuk az M3-típusú receptorok meghatározó jelentőségét a szemcsesejteken megfigyelhető kolinerg hatások közvetítésében.

Kalciumkoncentráció-mérés a nucleus cochlearisból készített túlélő agyszeletben

A DCN sejtjeinek spontán és karbakollal kiváltott kalciumtranzienseit fluoreszcens kalciumindikátor-festékkel töltött, túlélő agyszeletekben vizsgáltuk. A technika fontos előnye, hogy alkalmas sok neuron egyidejűleg történő vizsgálatára (Yuste és Katz, 1991; Schwartz és mtsai., 1998; Ikegaya és mtsai., 2005; Garaschuk és mtsai., 2006; Takahasi és mtsai., 2007). Az eljárás előnyeinek és korlátainak figyelembe vételével, hasonlóan néhány korábbi tanulmányhoz (Ikegaya, 2008; Usami és mtsai., 2008), a jelen disszertációban alkalmazott, túlélő agyszeletekben kivitelezett kalciumkoncentráció-mérést egyfajta farmakológiai „gyorstesztként” alkalmaztuk.

A DCN szeletben változó időbeli lefutású kalciumtranzienseket regisztráltunk. Kinetikai tulajdonságaik alapján a Ca^{2+} -tranziensek lassú és gyors csoportba voltak sorolhatók. Munkánkban bizonyítottuk, hogy a DCN-ben regisztrált gyors típusú kalcium jelek – az agykéreg (Helmchen és mtsai., 1996; Smetters és mtsai., 1999) és a hippocampus neuronjaihoz (Helmchen és mtsai., 1996) hasonlóan – akciós potenciálokhoz kapcsoltak. Ebből következően megalapozottan kijelenthető, hogy a gyors típusú kalciumjelek frekvenciájának változása neuronális aktivitásváltozást tükröz. Ezt kihasználva egyes tanulmányokban az agyszeletben elhelyezkedő neuronok AP-tüzelési mintázatára közvetett módon, a gyors típusú kalciumjelek előfordulása és megjelenése alapján következtettek; sőt az egyes neuronok egyidejű aktivitása alapján olykor azok szinaptikus kapcsoltságának valószínűségét is vizsgálták (Ikegaya és mtsai., 2005; Peterlin és mtsai., 2000; Smetters és mtsai., 1999). Szemben a gyors típusú kalciumjelekkel, amik neuronális eredetéhez kevés kétség férhet, a lassú típusú kalciumjelek megjelenése legvalószínűbben a gliasejtek aktivitásához köthető (Nimmerjahn és mtsai., 2004).

A gyors típusú kalciumtranziensek AP-kapcsolt természetének igazolását követően kidolgoztunk egy módszert, ami alkalmas nagyszámú Ca^{2+} -tranziens felismerésére, és részletes kinetikai jellemzésére, valamint a gyors és lassú típusú jelek megbízható elkülönítésére. Hasonló célt szolgáló, de részben eltérő elveken működő módszereket a jelen tanulmányt megelőzően is alkalmaztak (Gorbunova és Spitzer, 2002; Sasaki és mtsai., 2008; Mukamel és mtsai., 2009; Ruffinatti és mtsai., 2011). A vizsgálataink során alkalmazott felismerő és analízáló program javította a jel-zaj arányt, növelte az automatikus kalciumtranziens-felismerés megbízhatóságát, ezáltal hatékonyan el tudta választani a nyers fluoreszcens jelet a nagyfrekvenciájú zajtól. A legnagyobb frekvenciájú zajkomponensek elhagyása ugyanakkor megváltoztatta a kalciumtranziensek időbeli lefutását, ami esetenként problémát okozott a korrekt jelfelismerésben. A jelenség oka, hogy nagyfrekvenciájú aktivitás

esetén az egyébként különálló kalciumtranziensek részben vagy teljesen összeolvadnak (Helmchen és mtsai., 1996; Smetters és mtsai., 1999). Ezen fuzionált Ca^{2+} -tranziensek időbeli lefutását a zajszűrés okozta alakváltozás jelentősen torzította, és így az automatikus algoritmus számára igen nehezen felismerhetővé tette azokat. Az esetleges hibák számának lehető legalacsonyabbra szorítása érdekében az automatikusan felismert tranzienseket mindig ellenőriztük, és a hibásan felismert, részlegesen vagy teljesen egybeolvadt tranzienseket kizártuk a további vizsgálatból. Elemi megfontolásból következően a hibásan felismert tranziensek kizárása a Ca^{2+} -tranziensek frekvenciájának alulbecslését eredményezte, ami a jelfrekvencia növekedésével egyre jelentősebbé, és mintegy 10 perc^{-1} -es frekvencia felett kifejezetté vált. Kijelenthető azonban, hogy a módszer még ezen korlátai mellett is alkalmas volt a karbakol által kiváltott kalciumjelfrekvencia-növekedés kimutatására és jellemzésére.

A nucleus cochlearis dorsalis szemcsesejtjeinek kolinerg modulációja

Jelen munkában kizárólag a szemcsesejtek kalciumtranzienseit és kolinerg receptorait vizsgáltuk. A sejtválasztás egyik fontos indoka, hogy a szemcsesejtek igen nagy számban fordulnak elő a DCN-ben; ugyanakkor könnyen azonosíthatók – egyértelmű elkülönítésükhöz elegendő a méretük és lokalizációjuk meghatározása. A patkány DCN szemcsesejtek szomaátmérője $6\text{--}8 \mu\text{m}$ (Balakrishnan és Trussel, 2008; Mugnaini és mtsai., 1980 A; Mugnaini és mtsai., 1980 B; Rusznák és mtsai., 1997), így ezek a mag legkisebb sejtjei. Mivel a jelen munkában csak az ennek a tartománynak megfelelő átmérővel rendelkező sejteket vizsgáltuk, bizonyosak lehettünk abban, hogy kizárólag a szemcsesejtek vizsgálatára került sor. A sejtípus azonosításának helyességét tovább erősíti az tény, hogy a nucleus cochlearis dorsalis második legkisebb sejtjei, a Golgi-sejtek (Mugnaini és mtsai., 1980 B), hiperpolarizációval reagálnak kolinerg stimulációra (Irie és mtsai., 2006); ami szöges ellentétben áll a szemcsesejtek által hasonló körülmények között generált aktivitásfokozódással.

A szemcsesejtek vizsgálatát indokló további elem, hogy bár több dolgozat is felvetette a szemcsesejtek kolinerg modulálhatóságának lehetőségét, ennek részleteit ezidáig nem vizsgálták. A szemcsesejteket elérő kolinerg hatások közvetett bizonyítékai között megemlíthető, hogy számos kolinerg idegvégződést írtak le a nucleus cochlearis szemcsesejteket legnagyobb számban tartalmazó részein (McDonald és Rasmussen 1971; Ryugo és mtsai., 2003). Egy előző dolgozatunkban mi magunk is számot adtunk a DCN óriássejtjei és a parallel-rostok által képzett szinapszisokban a neurotranszmisszió preszinaptikusan elhelyezkedő, M3-típusú muszkarinos receptorokon keresztüli

befolyásolhatóságáról (Pál és mtsai., 2009). Mivel a parallel-rostok a szemcsesejtek axonjai, ezért joggal merült fel a kérdés, hogy a muszkarinos receptorok vajon csak a preszinaptikus membránban találhatóak-e meg, vagy a szemcsesejtek szomáján is jelen vannak – azaz vajon csak a szinaptikus transzmissziót, vagy a szemcsesejtek tüzelési mintázatát is befolyásolja-e a kolinerg stimuláció.

Az eredményekben ismertetett kísérletek rámutatnak arra, hogy kolinerg stimuláció közvetlenül, a szinaptikus transzmisszió egyidejű gátlása esetén is növeli a szemcsesejtek aktivitását. A hatás atropinnal teljes egészében kivédhető, azaz muszkarinos receptorokon keresztül valósul meg. Ez a megállapítás összhangban áll néhány korábbi tanulmány eredményével, melyek szerint muszkarinos receptorok felelősek a DCN-ben kolinerg stimulációval kiváltott aktivitásváltozásokért (Chen és mtsai., 1994); valamint hogy egy muszkarinos receptor-specifikus molekula (1-[N-metil-³H]szkopolamin) kötődése a DCN szemcsesejtek legnagyobb sűrűségben tartalmazó részein volt a legkifejezettebb (Jin és Godfrey, 2006). Eredményeink alapján kijelenthető, hogy a szemcsesejtek mind az M1-, mind az M3-típusú muszkarinos receptorfehérjét expresszálják. A funkcionális kísérletekben azt is bizonyítottuk, hogy a szemcsesejtek aktivitását befolyásoló kolinerg moduláció közvetítéséért jórészt az M3-as receptorok felelősek. Az a megállapításunk, miszerint hexamethónium alkalmazása nem védi ki a karbakol hatását arra utal, hogy a nikotinos receptorok nem bírnak számottevő jelentőséggel a kolinerg moduláció folyamatában. Ez a megfigyelésünk összhangban áll azokkal a megállapításokkal, miszerint bár igazolható a nikotinos receptorok jelenléte a nucleus cochlearisban (Happe és Morley, 1998; Yao és Godfrey, 1999 B), azok más sejttypusok, így például az óriás- (Pál és mtsai., 2009) vagy a Golgi-sejtek (Irie és mtsai., 2006) esetében sem vesznek részt a kolinerg hatások közvetítésében.

Eredményeink tanúsága szerint tehát a muszkarinos kolinerg receptorok aktivációja megnöveli a DCN szemcsesejtjein megfigyelhető gyors típusú kalciumtranziensek frekvenciáját. A jelenséghez szorosan kapcsolódó kérdés természetesen a muszkarinos aktiváció és a megnövekedett frekvenciájú Ca^{2+} -tranziensek közötti kapcsolat. A muszkarinos receptorok aktivációja kalciumfelszabadulást válthat ki egyes intracelluláris raktárakból. Egy másik eshetőség, hogy az M-típusú (KCNQ) K^{+} -csatornák következményes záródása miatt okozhatja a sejt felszíni membrán depolarizációját (Delmas és Brown, 2005). Az így kialakuló depolarizáció AP-tüzelést, és az ennek következtében megnyíló, feszültségfüggő kalciumcsatornákon keresztül történő kalciumbelépést eredményezhet. Mivel a jelen vizsgálatsorozatnak nem volt célja a Ca^{2+} -tranziensek eredetének beható tanulmányozása, az intracelluláris raktárak szerepét egyáltalán nem vizsgáltuk. Leírtuk ugyanakkor a gyors típusú

kalciumtranziensek AP-kapcsoltságát, és bizonyítottuk az extracelluláris térből történő kalciumbelépés nélkülözhetetlenségét a tranziensek kialakulása során. Ezen utóbbi adatok a „muszkarinos receptorok aktivációja – következményes depolarizáció” mechanizmusának jelenlétét és szerepét valószínűsítik.

Jelen munkában a szemcsesejteket közvetlen elérő kolinerg hatást vizsgáltuk, a glutamaterg, glicinerg és GABAerg neurotranszmisszió kombinált gátlása mellett. Érdeemes azonban megemlíteni, hogy fiziológiai körülmények között, azaz intakt neurotranszmisszió mellett, a kolinerg stimuláció közvetett úton is aktiválhatja a szemcsesejteket. Ismeretes, hogy a Golgi-sejtek egyebek között a szemcsesejteken is létesítenek gátló szinapszisokat (Irie és mtsai., 2006; Mugnaini és mtsai., 1980 B). A Golgi-sejtek kolinerg stimulációra hiperpolarizálódnak, aktivitásuk csökken, így a szemcsesejtek felszabadulnak egy tónusos gátlás alól (*disinhibitio*), ami aktivitásuk fokozódásához vezethet.

Fontos kérdés lenne annak tisztázása, hogy mi a kolinerg moduláció pontos jelentősége a nucleus cochlearis dorsalis funkciójában, és vajon hogyan kapcsolódik ehhez a szemcsesejtek kolinerg modulálhatósága. Ismeretes, hogy a nucleus cochlearis két fő forrásból kap kolinerg bemeneteket. Ezen kolinerg rostok java része az oliva superiorból származik és az olivo-cochlearis rostok kollaterálisai révén éri el a magot; a rostok kisebb része pedig a nucleus pedunculopontinus tegmentalis kolinerg idegsejteitől ered (Mellott és mtsai., 2011; Schofield és mtsai., 2011). Ezen bemenetek élettani jelentőségéről több teória is létezik, és elképzelhető, hogy a két forrásból származó kolinerg rostok eltérő funkció szolgálatában állnak. Az oliva superiorból származó kolinerg bemenet, a külső szőrsejtek gátlása mellett, érzékenyítheti a nucleus cochlearis egyes sejtjeit, így szerepe lehet a hallószervre jellemző igen széles dinamikus spektrum kialakításában, és adott frekvenciájú „értékes” hangok zajtól való elkülönítésében (Benson és Brown, 1990, Fujino és Oertel, 2001, Mellott és mtsai., 2011).

Ugyan a nucleus pedunculopontinus tegmentalisból származó kolinerg bemenetek lehetséges funkciója kevésbé ismert, a szerzők egyetértenek abban, hogy az ezen magból származó kapcsolatok fontosak lehetnek a nucleus cochlearis működésének szabályozásában. A nucleus pedunculopontinus tegmentalis kolinerg rostokat küld a hallópálya agytörzsi magvaihoz, valamint a thalamushoz is (Steriade és mtsai., 1988; Motts és Schofield, 2009; Motts és Schofield, 2010; Mellott és mtsai., 2011), és – részben ezen kapcsolatok révén – fontos szerepet játszik az alvás-ébrenlét, a sensoros kapuzás, a figyelem és a mozgás szabályozásában (Steriade, 2004; Yeomans és mtsai., 2006; Jones, 2008; Pahapill és Lozano, 2000; Winn, 2006). Elképzelhető, hogy a nucleus pedunculopontinus tegmentalis nucleus

cochlearis felé irányuló projekciója a sensoros kapuzás és a figyelem szabályozása szempontjából fontos, mivel ezen rostok aktivitása hatást gyakorolhat a hallási információ továbbítására.

Egyes vélemények szerint a nucleus cochlearist elérő kolinerg moduláció túlfokozott volta fülzúgáshoz (tinnitus) vezethet: a tinnitus erős hangterheléssel kiváltott kísérletes állatmodelljénél például a kolin-acetil-transzferáz enzim aktivitásának fokozódását (Jin, és mtsai., 2006), és bizonyos DCN neuronok karbakol iránt mutatott érzékenységének növekedését írták le (Chang és mtsai., 2002; Kaltenbach és Zhang, 2007). Általánosan elfogadott, hogy a fülzúgást olyan neuronális hiperaktivitás kíséri, ami a hallópálya több szintjén is megfigyelhető, egyebek között a nucleus cochlearisban (Brozoski és mtsai., 2002), a colliculus inferiorban (Mulders és Robertson, 2009), vagy a hallókéregben (Eggermont és Kenmochi, 1998; Roberts és mtsai., 2010). A hiperaktivitás részletei és eredete azonban vitatottak, és annak eredetére is számos, olykor nehezen összeegyeztethető teória létezik (Roberts és mtsai., 2010; Kaltenbach, 2011). A tinnitus egyik kísérletes állatmodelljénél például leírták a DCN piramis-sejtjeinek fokozott spontán aktivitását (Brozoski és mtsai., 2002), más szerzők ugyanakkor, ugyanezen kísérleti körülmények között, a DCN piramis-sejtek csökkent és a cartwheel-sejtek fokozott aktivitásáról számoltak be (Chang és mtsai., 2002; Kaltenbach és Zhang, 2007).

A fülzúgás bizonyos esetekben fej-nyaki somatosensoros stimulációval is kiváltható; vagy az képes a már meglévő tinnitus erősségét módosítani (Levin, 2000; Cacace, 2003). Ebből következően a tinnitus tehát somatosensorosan modulálható. Mivel a somatosensoros információ a szemcsesejteken keresztül éri el a DCN neuronhálózatát, a szemcsesejtek kolinerg modulálhatósága jelentős szereppel bírhat a tinnitus pathogenesisében. Ezt a feltételezést látszik aláhúzni az a megállapítás is, miszerint a tinnitus hátterében a DCN piramis- és cartwheel-sejtjeinek aktivitásváltozása áll; különösen mivel a cochlearis szemcsesejtek aktivitása számottevően befolyásolja mindkét sejt működését. Ha elfogadjuk, hogy a tinnitus kialakulása során a nucleus cochlearis dorsalis egyes sejtjeinek megnövekedett aktivitása egy túlfokozott kolinerg hatás következménye, akkor megalapozott azt feltételezni, hogy ez, legalábbis részben, a szemcsesejtek fokozott kolinerg stimulációjának tulajdonítható.

A disszertáció legfontosabb megállapításai

1. Elvégeztük a nucleus cochlearis dorsalis Purkinje-szerű sejtek morfológiájának részletes analízisét.
2. Megmutattuk, hogy a PLC-k által szintetizált neurotranszmitter a GABA.
3. Leírtuk a cerebellin PLC-n belüli megoszlási mintázatát és összehasonlítottuk azt a kisagyi Purkinje-sejtekével. Megállapítottuk, hogy míg a PLC-k esetében a cerebellin leginkább a sejttestben található, a kisagyi Purkinje-sejtekben a sejttestben és a dendritfában egyaránt kimutatható.
4. Meghatároztuk a PLC-k nyugalmi membránpotenciálját. Megállapítottuk, hogy a PLC-k spontán akciós potenciálokat nem tüzelnek, depolarizáló áramimpulzus alkalmazására pedig nem-adaptálódó akcióspotenciál-tüzeléssel reagálnak.
5. Kimutattuk, hogy a PLC-k expresszálják a h-áramot.
6. A PLC-kről nagy frekvenciájú inhibítorikus posztszinaptikus áramokat vezettünk el, ami alapján arra következtetünk, hogy ezen sejtek aktív részét képezik a nucleus cochlearis dorsalis neuronhálózatának.
7. Meghatároztuk, hogy az inhibítorikus posztszinaptikus áramok 76%-a glicinerg, 24%-a pedig GABAerg szinapszisok aktiválódásának a következménye.
8. Túlélő agyszeletekben végzett intracelluláris kalciumkoncentráció-mérés alkalmazásával igazoltuk a DCN sejtek által produkált, gyors típusú kalciumtranziensek akcióspotenciál-kapcsolt voltát.
9. Kimutattuk, hogy kolinerg stimuláció növeli a DCN szemcsesejtekről elvezethető gyors típusú kalciumtranziensek frekvenciáját.
10. Leírtuk, hogy a szemcsesejteken megfigyelt kolinerg hatás atropinnal kivédhető, de hexamethoniummal nem. Ezzel igazoltuk, hogy a kolinerg hatást muszkarinos receptorok közvetítik.
11. Immunhisztokémia alkalmazásával kimutattuk, hogy a szemcsesejtek mind az M1, mind az M3 muszkarinreceptor-altípust expresszálják.
12. Kimutattuk, hogy az M3-receptor-specifikus antagonistá 4-DAMP teljes mértékben kivédi, míg az M1-specifikus antagonistá pirenzepin nem befolyásolja a kolinerg hatást. Ebből arra következtetünk, hogy a kolinerg moduláció közvetítésében az M3-típusú receptornak van meghatározó jelentősége.

Összefoglalás

A nervus acusticus akcióspotenciál-mintázata a hang valamennyi érzékelhető tulajdonságát hordozza. A hallóideg aktivitásának hangérzetté való alakításáért egy olyan központi idegrendszeri hálózat felelős, ami a nucleus cochlearisszal kezdődik és a hallókéregben ér véget. A nucleus cochlearis azonban nem pusztán a központi idegrendszeri hallópályák kiinduló pontja, de ez a struktúra felelős azért is, hogy a beérkező hallási információ több, egymással párhuzamosan haladó, felszálló pályára kerüljön át. Ezen felszálló pályák egy jelentős hányada a hang egy-egy speciális tulajdonságáról közvetít információt, ami nélkülözhetetlen a hanginger jellemzőinek központi idegrendszeri rekonstrukciójához.

A specifikus és intenzív kutatómunka ellenére is hézagosak az ismereteink a nucleus cochlearis és az abban található nagy számú neurontípus funkciójával kapcsolatban. Különösen kevés adat áll rendelkezésre a mag legkisebb, ugyanakkor legnagyobb számban előforduló sejttípusáról, a szemcse-sejtekről. Még ennél is kevesebbet tudunk az elsősorban a nucleus cochlearis dorsalis részében előforduló, igen jellegzetes morfológiát mutató sejttípusról, a Purkinje-szerű sejtekről (PLC). Utóbbi neuronféleség esetében még az sem ismert, hogy vajon részét képezik-e a nucleus cochlearis neuronhálózatának, vagy funkció nélküli, ectopiás Purkinje-neuronokról van szó. Jelen disszertáció patkány nucleus cochlearis dorsalis szemcse- és Purkinje-szerű sejteinek vizsgálatát tűzte ki célul. Kísérleteinket elektrofiziológiai és képalkotó módszerek kombinált alkalmazásával végeztük.

Munkánk első részében a Purkinje-szerű sejtek morfológiai jellemzőit vizsgáltuk, amihez ezen neurontípus intenzív calbindin-pozitivitása nyújtott segítséget. Kettős immunjelölés és konfokális mikroszkópia alkalmazása után megmutattuk, hogy a PLC-k rendelkeznek a GABA bioszintéziséhez nélkülözhetetlen glutamát dekarboxilázzal. Ez a megfigyelés azt valószínűsíti, hogy a PLC-k GABAerg gátlóneuronok. Túlélő agyszelet-preparátum és teljes-sejtes patch-clamp segítségével az irodalomban elsőként írtuk le ezen sejttípus akcióspotenciál-tüzelési mintázatát. Bebizonyítottuk továbbá, hogy a Purkinje-szerű sejtek rendelkeznek a hiperpolarizáció hatására aktiválódó, nem-specifikus kationárammal (I_h). A PLC-k sejtestéről elvezetett posztisznaptikus áramok vizsgálata arra is bizonyítékot szolgáltatott, hogy a sejttípus aktív részese a DCN neuronhálózatának. Megállapítottuk, hogy a PLC-kről elvezethető gátló hatású posztszinaptikus áramok 76%-a glicinerg szinapszisok aktivitását tükrözi, míg a fennmaradó 24% GABAerg bemeneteken keresztül érkezik. Arra is rámutattunk, hogy bár a cerebellaris Purkinje-sejtekhez hasonlóan a PLC-k is erős cerebellin-

1 immunpozitivitást mutatnak, a fehérje sejten belüli eloszlása különbözik a két sejtfeleségben.

Az egyik olyan neurontípus, aminek aktivitása jelentősen módosíthatja a nucleus cochlearis egyéb sejtjeinek – beleértve a PLC-ket is – aktivitását és működését, a cochlearis szemcsesejt. A szemcsesejtek különös jelentőségét az adja, hogy somatosensoros információ is eléri őket. Ebből kiindulva megalapozottnak tűnik az a feltételezés, hogy a szemcsesejtek alapvető jelentőségűek a somaticus és acusticus stimulusok nucleus cochlearison belüli ötvözésében. Bár léteztek arra adatok, hogy a szemcsesejtek működését kolinerg moduláció is befolyásolhatja, a jelenség részleteinek leírására ezidáig nem került sor. Ebből kiindulva munkánk második felében azt vizsgáltuk, hogy hogyan befolyásolja a szemcsesejtek intracelluláris kalciumkoncentrációját a kolinerg stimuláció. Kísérleteinket túlélő agyszletekben elhelyezkedő, kalciumérzékeny fluoreszcens festékkel feltöltött szemcsesejteken végeztük. A vizsgálatsorozat kezdetén bizonyítottuk a szemcsesejtek gyors típusú intracellularis Ca^{2+} -jeleinek akcióspotenciál-kapcsolt voltát, majd kidolgoztunk egy módszert ezen Ca^{2+} -jelek megbízható, automatikus azonosítására és kinetikai paramétereik jellemzésére. Megmutattuk, hogy a kolinerg stimuláció még a serkentő és gátló hatású szinaptikus transzmisszió egyidejű gátlása esetén is szignifikánsan megnöveli a szemcsesejtek aktivitását, ezáltal az általuk produkált gyors típusú Ca^{2+} -jelek frekvenciáját. Specifikus antagonistákkal végzett kísérletekben arra is rámutattunk, hogy az általunk feltárt kolinerg hatást muszkarinos receptorok közvetítik. Bebizonyítottuk, hogy bár a szemcsesejtek mind az M1-, mind az M3-típusú muszkarinos receptort expresszálják, a funkcionális hatások kialakításáért döntően az utóbbi receptortípus aktiválódása felelős.

Eredményeink hozzásegítenek annak megértéséhez, hogy a szemcse- és Purkinje-szerű sejtek hogyan illeszkednek a nucleus cochlearist felépítő neuronális hálózatba, így pontosabb képet nyerhetünk ezen bonyolult, a hallási információ központi idegrendszeri feldolgozásához nélkülözhetetlen struktúra működéséről.

Summary

The action potential firing pattern of the acoustic nerve encodes all recognisable features of the sound. The conversion of the activity of the auditory nerve to acoustic sensation is carried out by a neuronal network that begins in the cochlear nucleus and terminates in the auditory cortex. The cochlear nucleus, however, is not the mere starting point of the central auditory pathways but it passes the incoming acoustic information onto several, parallel ascending pathways. A number of these pathways relay information about specific features of the sound. This arrangement is essential for the reconstruction of the overall characteristics of the auditory stimuli. This highly complicated task is carried out by the central auditory system.

Despite all the intense and specific research efforts, our knowledge about the function of either the cochlear nucleus or its individual cell types is still obscure. Particularly little information is available about the granule cells that represent the smallest, yet most numerous cell type of the cochlear nucleus. Even less is known about the Purkinje-like cells (PLCs). PLCs are mostly located in the dorsal cochlear nucleus and show highly characteristic morphology. It is still not clear, for example, whether PLCs are integrant parts of the neuronal network of the cochlear nucleus or they are mere ectopic Purkinje neurons, without function. For these reasons, the present work aimed at investigating the granule neurones and the PLCs of the rat dorsal cochlear nucleus. The experiments have been carried out by combined application of electrophysiological and imaging techniques.

In the first part of our work the morphological characteristics of the PLCs were investigated. This phase of our experiments exploited the intense calbindin-specific immunopositivity of the PLCs. Using double immunolabelling and confocal microscopy; we demonstrated that PLCs express glutamate-decarboxylase, an enzyme which is essential for GABA biosynthesis. This observation suggests that the PLCs are GABAergic inhibitory neurones. Using whole-cell patch-clamp in a brain slice preparation, for the first time in the literature, we revealed the action potential firing pattern of the PLCs. We showed that PLCs possess the hyperpolarisation-activated non-specific cationic current (I_h). Analysis of postsynaptic currents recorded from the somata of PLCs indicated that this cell type is an active member of the neuronal network situated in the dorsal cochlear nucleus. We showed that 76% of the inhibitory postsynaptic currents recorded from the PLCs reflect the activity of glycinergic synapses, while the remaining 24% reach the PLC bodies via GABAergic inputs. We also pointed out that although cerebellar Purkinje-neurones and PLCs are similar in terms of their

strong cerebellin-1 immunopositivity, the intracellular distribution of cerebellin-1 is different in these cell types.

One of the neurones whose activity may significantly modify the function of all other cell types of the dorsal cochlear nucleus — including PLCs — is the cochlear granule cell. Granule neurones are particularly important because they receive somatosensory information, too. It is reasonable to assume, therefore, that granule cells play fundamental roles in the integration of auditory and somatic stimuli within the cochlear nucleus. Although there have been data indicating that the function of the granule cells is affected by cholinergic modulation, a detailed analysis of this mechanism is yet to be performed. Consequently, in the second part of the present work, we have been studying the effects of cholinergic stimulation on the intracellular calcium concentration of the granule neurones. The experiments were carried out on calcium-sensitive fluorescent dye-loaded granule cells situated in a thin slice preparation. At the beginning of the work, we demonstrated the action potential-coupled character of the rapid calcium transients recorded from the granule cells. In the next step we introduced a method that automatically detects calcium concentration changes and determines their kinetic features. We showed that cholinergic stimulation significantly increases the activity of the granule cells and, consequently, the frequency of their rapid calcium transients — even when both excitatory and inhibitory synaptic inputs are blocked. Using specific antagonists, we demonstrated that this cholinergic influence is mediated by muscarinic receptors. We showed that although granule neurones express both M1 and M3 muscarinic receptors, the functional effects are primarily mediated by the activation of M3 receptors.

Our results help us to understand better how granule neurones and PLCs are integrated into the complex neuronal network of the cochlear nucleus. Consequently, as the result of our observations, one may have more comprehensive information depicting the function of this highly complicated structure without which central processing of the auditory information would be impossible.

Irodalomjegyzék

Alibardi L. Ultrastructural immunocytochemistry for glycine in neurons of the dorsal cochlear nucleus of the guinea pig. *J Submicrosc Cytol Pathol* 35: 4: 373–387, 2003.

Ashmore J. Cochlear outer hair cell motility. *Physiol Rev* 88: 1: 173–210, 2008.

Balakrishnan V and Trussell LO. Synaptic inputs to granule cells of the dorsal cochlear nucleus. *J Neurophysiol* 99: 1: 208–219, 2008.

Békésy G. *Experiments in hearing*. 1960.

Bell C, Bodznick D, Montgomery J and Bastian J. The generation and subtraction of sensory expectations within cerebellum-like structures. *Brain Behav Evol* 50 Suppl 1: 17–31, 1997.

Bell CC, Caputi A, Grant K and Serrier J. Storage of a sensory pattern by anti-Hebbian synaptic plasticity in an electric fish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 10: 4650–4654, 1993.

Bell CC, Han V and Sawtell NB. Cerebellum-like structures and their implications for cerebellar function. *Annu Rev Neurosci* 31: 1–24, 2008.

Benson TE and Brown MC. Synapses formed by olivocochlear axon branches in the mouse cochlear nucleus. *J Comp Neurol* 295: 1: 52–70, 1990.

Bosman LW, Takechi H, Hartmann J, Eilers J and Konnerth A. Homosynaptic long-term synaptic potentiation of the "winner" climbing fiber synapse in developing Purkinje cells. *J Neurosci* 28: 4: 798–807, 2008.

Brawer JR and Morest DK. Relations between auditory nerve endings and cell types in the cat's anteroventral cochlear nucleus seen with the Golgi method and Nomarski optics. *J Comp Neurol* 160: 4: 491–506, 1975.

Brawer JR, Morest DK and Kane EC. The neuronal architecture of the cochlear nucleus of the cat. *J Comp Neurol* 155: 3: 251–300, 1974.

Brown DA and Adams PR. Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neurone. *Nature* 283: 5748: 673–676, 1980.

Brown MC, Liberman MC, Benson TE and Ryugo DK. Brainstem branches from olivocochlear axons in cats and rodents. *J Comp Neurol* 278: 4: 591–603, 1988.

Brownell WE, Bader CR, Bertrand D and de Ribaupierre Y. Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science* 227: 4683: 194–196, 1985.

Brozoski TJ, Bauer CA and Caspary DM. Elevated fusiform cell activity in the dorsal cochlear nucleus of chinchillas with psychophysical evidence of tinnitus. *J Neurosci* 22: 6: 2383–2390, 2002.

Bukowska D. Morphological evidence for secondary vestibular afferent connections to the dorsal cochlear nucleus in the rabbit. *Cells Tissues Organs* 170: 1: 61–68, 2002.

Burian M and Gstoettner W. Projection of primary vestibular afferent fibres to the cochlear nucleus in the guinea pig. *Neurosci Lett* 84: 1: 13–17, 1988.

Cacace AT. Expanding the biological basis of tinnitus: crossmodal origins and the role of neuroplasticity. *Hear Res* 175: 1–2: 112–132, 2003.

Caicedo A and Herbert H. Topography of descending projections from the inferior colliculus to auditory brainstem nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 328: 3: 377–392, 1993.

Cant NB and Benson CG. Parallel auditory pathways: projection patterns of the different neuronal populations in the dorsal and ventral cochlear nuclei. *Brain Res Bull* 60: 5–6: 457–474, 2003.

Chang H, Chen K, Kaltenbach JA, Zhang J and Godfrey DA. Effects of acoustic trauma on dorsal cochlear nucleus neuron activity in slices. *Hear Res* 164: 1–2: 59–68, 2002.

- Chen K, Waller HJ and Godfrey DA.** Cholinergic modulation of spontaneous activity in rat dorsal cochlear nucleus. *Hear Res* 77: 1–2: 168–176, 1994.
- Dallos P, Wu X, Cheatham MA, Gao J, Zheng J, Anderson CT, Jia S, Wang X, Cheng WH, Sengupta S, He DZ and Zuo J.** Prestin-based outer hair cell motility is necessary for mammalian cochlear amplification. *Neuron* 58: 3: 333–339, 2008.
- Delmas P and Brown DA.** Pathways modulating neural KCNQ/M (Kv7) potassium channels. *Nat Rev Neurosci* 6: 11: 850–862, 2005.
- Dreiling FJ, Henson MM and Henson OW, Jr.** The presence and arrangement of type II collagen in the basilar membrane. *Hear Res* 166: 1–2: 166–180, 2002.
- Eggermont JJ and Kenmochi M.** Salicylate and quinine selectively increase spontaneous firing rates in secondary auditory cortex. *Hear Res* 117: 1–2: 149–160, 1998.
- Emadi G, Richter CP and Dallos P.** Stiffness of the gerbil basilar membrane: radial and longitudinal variations. *J Neurophysiol* 91: 1: 474–488, 2004.
- Fekete DM, Rouiller EM, Liberman MC and Ryugo DK.** The central projections of intracellularly labeled auditory nerve fibers in cats. *J Comp Neurol* 229: 3: 432–450, 1984.
- Fonyó A.** *Az orvosi élettan tankönyve.* Medicina, 1999.
- Fujino K and Oertel D.** Bidirectional synaptic plasticity in the cerebellum-like mammalian dorsal cochlear nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 1: 265–270, 2003.
- Fujino K and Oertel D.** Cholinergic modulation of stellate cells in the mammalian ventral cochlear nucleus. *J Neurosci* 21: 18: 7372–7383, 2001.
- Garaschuk O, Milos RI, Grienberger C, Marandi N, Adelsberger H and Konnerth A.** Optical monitoring of brain function in vivo: from neurons to networks. *Pflugers Arch* 453: 3: 385–396, 2006.
- Golding NL and Oertel D.** Physiological identification of the targets of cartwheel cells in the dorsal cochlear nucleus. *J Neurophysiol* 78: 1: 248–260, 1997.
- Gorbunova YV and Spitzer NC.** Dynamic interactions of cyclic AMP transients and spontaneous Ca(2+) spikes. *Nature* 418: 6893: 93–96, 2002.
- Guinan JJ, Jr, Salt A and Cheatham MA.** Progress in cochlear physiology after Bekesy. *Hear Res* 2012.
- Hackney CM, Osen KK and Kolston J.** Anatomy of the cochlear nuclear complex of guinea pig. *Anat Embryol (Berl)* 182: 2: 123–149, 1990.
- Happe HK and Morley BJ.** Nicotinic acetylcholine receptors in rat cochlear nucleus: [125I]-alpha-bungarotoxin receptor autoradiography and in situ hybridization of alpha 7 nAChR subunit mRNA. *J Comp Neurol* 397: 2: 163–180, 1998.
- Helmchen F, Imoto K and Sakmann B.** Ca²⁺ buffering and action potential-evoked Ca²⁺ signaling in dendrites of pyramidal neurons. *Biophys J* 70: 2: 1069–1081, 1996.
- Hirai H, Pang Z, Bao D, Miyazaki T, Li L, Miura E, Parris J, Rong Y, Watanabe M, Yuzaki M and Morgan JL.** Cbln1 is essential for synaptic integrity and plasticity in the cerebellum. *Nat Neurosci* 8: 11: 1534–1541, 2005.
- Hudspeth AJ, Julicher F and Martin P.** A critique of the critical cochlea: Hopf--a bifurcation--is better than none. *J Neurophysiol* 104: 3: 1219–1229, 2010.
- Hurd LB, 2nd and Feldman ML.** Purkinje-like cells in rat cochlear nucleus. *Hear Res* 72: 1–2: 143–158, 1994.
- Ikegaya Y.** Large-scale recordings for drug screening in neural circuit systems. *Yakugaku Zasshi* 128: 9: 1251–1257, 2008.

- Ikegaya Y, Le Bon-Jego M and Yuste R.** Large-scale imaging of cortical network activity with calcium indicators. *Neurosci Res* 52: 2: 132–138, 2005.
- Irie T, Fukui I and Ohmori H.** Activation of GIRK channels by muscarinic receptors and group II metabotropic glutamate receptors suppresses Golgi cell activity in the cochlear nucleus of mice. *J Neurophysiol* 96: 5: 2633–2644, 2006.
- Iurato S.** Functional Implications of the Nature and Submicroscopic Structure of the Tectorial and Basilar Membranes. *J Acoust Soc Am* 34: 9B: 1386, 1962.
- Jin YM and Godfrey DA.** Effects of cochlear ablation on muscarinic acetylcholine receptor binding in the rat cochlear nucleus. *J Neurosci Res* 83: 1: 157–166, 2006.
- Jin YM, Godfrey DA, Wang J and Kaltenbach JA.** Effects of intense tone exposure on choline acetyltransferase activity in the hamster cochlear nucleus. *Hear Res* 216–217: 168–175, 2006.
- Johnson SL, Beurg M, Marcotti W and Fettiplace R.** Prestin-driven cochlear amplification is not limited by the outer hair cell membrane time constant. *Neuron* 70: 6: 1143–1154, 2011.
- Jones BE.** Modulation of cortical activation and behavioral arousal by cholinergic and orexinergic systems. *Ann N Y Acad Sci* 1129: 26–34, 2008.
- Joris PX.** Response classes in the dorsal cochlear nucleus and its output tract in the chloralose-anesthetized cat. *J Neurosci* 18: 10: 3955–3966, 1998.
- Kaltenbach JA.** Tinnitus: Models and mechanisms. *Hear Res* 276: 1–2: 52–60, 2011.
- Kaltenbach JA and Zhang J.** Intense sound-induced plasticity in the dorsal cochlear nucleus of rats: evidence for cholinergic receptor upregulation. *Hear Res* 226: 1–2: 232–243, 2007.
- Kaneko M, Yamaguchi K, Eiraku M, Sato M, Takata N, Kiyohara Y, Mishina M, Hirase H, Hashikawa T and Kengaku M.** Remodeling of monopolar Purkinje cell dendrites during cerebellar circuit formation. *PLoS One* 6: 5: e20108, 2011.
- Kanold PO and Young ED.** Proprioceptive information from the pinna provides somatosensory input to cat dorsal cochlear nucleus. *J Neurosci* 21: 19: 7848–7858, 2001.
- Konnerth A, Llano I and Armstrong CM.** Synaptic currents in cerebellar Purkinje cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 7: 2662–2665, 1990.
- Krnjevic K, Pumain R and Renaud L.** The mechanism of excitation by acetylcholine in the cerebral cortex. *J Physiol* 215: 1: 247–268, 1971.
- Levine RA.** Somatic modulation of tinnitus: prevalence and properties. *Assoc Res Otolaryngol* 2000.
- Liberman LD, Wang H and Liberman MC.** Opposing gradients of ribbon size and AMPA receptor expression underlie sensitivity differences among cochlear-nerve/hair-cell synapses. *J Neurosci* 31: 3: 801–808, 2011.
- Liberman MC.** Single-neuron labeling in the cat auditory nerve. *Science* 216: 4551: 1239–1241, 1982.
- Liberman MC, Gao J, He DZ, Wu X, Jia S and Zuo J.** Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier. *Nature* 419: 6904: 300–304, 2002.
- Lu TK, Zhak S, Dallos P and Sarpeshkar R.** Fast cochlear amplification with slow outer hair cells. *Hear Res* 214: 1–2: 45–67, 2006.
- McDonald DM and Rasmussen GL.** Ultrastructural characteristics of synaptic endings in the cochlear nucleus having acetylcholinesterase activity. *Brain Res* 28: 1: 1–18, 1971.
- McKay BE and Turner RW.** Physiological and morphological development of the rat cerebellar Purkinje cell. *J Physiol* 567: Pt 3: 829–850, 2005.
- Mellott JG, Motts SD and Schofield BR.** Multiple origins of cholinergic innervation of the cochlear nucleus. *Neuroscience* 180: 138–147, 2011.

- Merchan-Perez A and Liberman MC.** Ultrastructural differences among afferent synapses on cochlear hair cells: correlations with spontaneous discharge rate. *J Comp Neurol* 371: 2: 208–221, 1996.
- Moore JK.** The primate cochlear nuclei: loss of lamination as a phylogenetic process. *J Comp Neurol* 193: 3: 609–629, 1980.
- Motts SD and Schofield BR.** Cholinergic and non-cholinergic projections from the pedunculopontine and laterodorsal tegmental nuclei to the medial geniculate body in Guinea pigs. *Front Neuroanat* 4: 137, 2010.
- Motts SD and Schofield BR.** Sources of cholinergic input to the inferior colliculus. *Neuroscience* 160: 1: 103–114, 2009.
- Mugnaini E.** GABA neurons in the superficial layers of the rat dorsal cochlear nucleus: light and electron microscopic immunocytochemistry. *J Comp Neurol* 235: 1: 61–81, 1985.
- Mugnaini E and Morgan JI.** The neuropeptide cerebellin is a marker for two similar neuronal circuits in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 23: 8692–8696, 1987.
- Mugnaini E, Osen KK, Dahl AL, Friedrich VL, Jr and Korte G.** Fine structure of granule cells and related interneurons (termed Golgi cells) in the cochlear nuclear complex of cat, rat and mouse. *J Neurocytol* 9: 4: 537–570, 1980a.
- Mugnaini E, Warr WB and Osen KK.** Distribution and light microscopic features of granule cells in the cochlear nuclei of cat, rat, and mouse. *J Comp Neurol* 191: 4: 581–606, 1980b.
- Mukamel EA, Nimmerjahn A and Schnitzer MJ.** Automated analysis of cellular signals from large-scale calcium imaging data. *Neuron* 63: 6: 747–760, 2009.
- Mulders WH and Robertson D.** Hyperactivity in the auditory midbrain after acoustic trauma: dependence on cochlear activity. *Neuroscience* 164: 2: 733–746, 2009.
- Musicant AD, Chan JC and Hind JE.** Direction-dependent spectral properties of cat external ear: new data and cross-species comparisons. *J Acoust Soc Am* 87: 2: 757–781, 1990.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Kerr JN and Helmchen F.** Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nat Methods* 1: 1: 31–37, 2004.
- Nixon PD.** The role of the cerebellum in preparing responses to predictable sensory events. *Cerebellum* 2: 2: 114–122, 2003.
- Nó L.** Anatomy of the eighth nerve. III. General plan of structure of the primary cochlear nucleus. *Laryngoscope* 43: 327, 1933.
- Nolan MF, Malleret G, Lee KH, Gibbs E, Dudman JT, Santoro B, Yin D, Thompson RF, Siegelbaum SA, Kandel ER and Morozov A.** The hyperpolarization-activated HCN1 channel is important for motor learning and neuronal integration by cerebellar Purkinje cells. *Cell* 115: 5: 551–564, 2003.
- Nowak LM and Macdonald RL.** Ionic mechanism of muscarinic cholinergic depolarization of mouse spinal cord neurons in cell culture. *J Neurophysiol* 49: 3: 792–803, 1983.
- Oertel D and Young ED.** What's a cerebellar circuit doing in the auditory system? *Trends Neurosci* 27: 2: 104–110, 2004.
- Osen KK.** Cytoarchitecture of the cochlear nuclei in the cat. *J Comp Neurol* 136: 4: 453–484, 1969.
- Pahapill PA and Lozano AM.** The pedunculopontine nucleus and Parkinson's disease. *Brain* 123 (Pt 9): Pt 9: 1767–1783, 2000.
- Pal B, Koszeghy A, Pap P, Bakondi G, Pocsai K, Szucs G and Rusznak Z.** Targets, receptors and effects of muscarinic neuromodulation on giant neurones of the rat dorsal cochlear nucleus. *Eur J Neurosci* 30: 5: 769–782, 2009.

- Paxinos G and Watson C.** *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, 2007.
- Perez C, Vega R and Soto E.** Phospholipase C-mediated inhibition of the M-potassium current by muscarinic-receptor activation in the vestibular primary-afferent neurons of the rat. *Neurosci Lett* 468: 3: 238–242, 2010.
- Peterlin ZA, Kozloski J, Mao BQ, Tsiola A and Yuste R.** Optical probing of neuronal circuits with calcium indicators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 7: 3619–3624, 2000.
- Pocsai K, Pal B, Pap P, Bakondi G, Kosztka L, Rusznak Z and Szucs G.** Rhodamine backfilling and confocal microscopy as a tool for the unambiguous identification of neuronal cell types: a study of the neurones of the rat cochlear nucleus. *Brain Res Bull* 71: 5: 529–538, 2007.
- Por A, Pocsai K, Rusznak Z and Szucs G.** Presence and distribution of three calcium binding proteins in projection neurons of the adult rat cochlear nucleus. *Brain Res* 1039: 1–2: 63–74, 2005.
- Rhode WS.** Vertical cell responses to sound in cat dorsal cochlear nucleus. *J Neurophysiol* 82: 2: 1019–1032, 1999.
- Rhode WS.** Observations of the vibration of the basilar membrane in squirrel monkeys using the Mossbauer technique. *J Acoust Soc Am* 49: 4: Suppl 2:1218+, 1971.
- Rhode WS and Smith PH.** Physiological studies on neurons in the dorsal cochlear nucleus of cat. *J Neurophysiol* 56: 2: 287–307, 1986.
- Rhode WS, Smith PH and Oertel D.** Physiological response properties of cells labeled intracellularly with horseradish peroxidase in cat dorsal cochlear nucleus. *J Comp Neurol* 213: 4: 426–447, 1983.
- Rice JJ, May BJ, Spirou GA and Young ED.** Pinna-based spectral cues for sound localization in cat. *Hear Res* 58: 2: 132–152, 1992.
- Roberts LE, Eggermont JJ, Caspary DM, Shore SE, Melcher JR and Kaltenbach JA.** Ringing ears: the neuroscience of tinnitus. *J Neurosci* 30: 45: 14972–14979, 2010.
- Robles L and Ruggero MA.** Mechanics of the mammalian cochlea. *Physiol Rev* 81: 3: 1305–1352, 2001.
- Röhlich P.** *Szövektan*. Semmelweis, 1999.
- Rubio ME, Gudsnek KA, Smith Y and Ryugo DK.** Revealing the molecular layer of the primate dorsal cochlear nucleus. *Neuroscience* 154: 1: 99–113, 2008.
- Ruffinatti FA, Lovisolo D, Distasi C, Ariano P, Erriquez J and Ferraro M.** Calcium signals: analysis in time and frequency domains. *J Neurosci Methods* 199: 2: 310–320, 2011.
- Ruggero MA and Rich NC.** Furosemide alters organ of corti mechanics: evidence for feedback of outer hair cells upon the basilar membrane. *J Neurosci* 11: 4: 1057–1067, 1991.
- Rusznak Z, Forsythe ID, Brew HM and Stanfield PR.** Membrane currents influencing action potential latency in granule neurons of the rat cochlear nucleus. *Eur J Neurosci* 9: 11: 2348–2358, 1997.
- Ryugo DK, Haenggeli CA and Doucet JR.** Multimodal inputs to the granule cell domain of the cochlear nucleus. *Exp Brain Res* 153: 4: 477–485, 2003.
- Ryugo DK and May SK.** The projections of intracellularly labeled auditory nerve fibers to the dorsal cochlear nucleus of cats. *J Comp Neurol* 329: 1: 20–35, 1993.
- Ryugo DK and Parks TN.** Primary innervation of the avian and mammalian cochlear nucleus. *Brain Res Bull* 60: 5–6: 435–456, 2003.
- Ryugo DK and Willard FH.** The dorsal cochlear nucleus of the mouse: a light microscopic analysis of neurons that project to the inferior colliculus. *J Comp Neurol* 242: 3: 381–396, 1985.
- Sasaki T, Takahashi N, Matsuki N and Ikegaya Y.** Fast and accurate detection of action potentials from somatic calcium fluctuations. *J Neurophysiol* 100: 3: 1668–1676, 2008.

- Schmiedt RA.** Spontaneous rates, thresholds and tuning of auditory-nerve fibers in the gerbil: comparisons to cat data. *Hear Res* 42: 1: 23–35, 1989.
- Schofield BR and Cant NB.** Ventral nucleus of the lateral lemniscus in guinea pigs: cytoarchitecture and inputs from the cochlear nucleus. *J Comp Neurol* 379: 3: 363–385, 1997.
- Schofield BR and Coomes DL.** Auditory cortical projections to the cochlear nucleus in guinea pigs. *Hear Res* 199: 1–2: 89–102, 2005.
- Schofield BR, Motts SD and Mellott JG.** Cholinergic cells of the pontomesencephalic tegmentum: connections with auditory structures from cochlear nucleus to cortex. *Hear Res* 279: 1–2: 85–95, 2011.
- Schwartz TH, Rabinowitz D, Unni V, Kumar VS, Smetters DK, Tsiola A and Yuste R.** Networks of coactive neurons in developing layer 1. *Neuron* 20: 3: 541–552, 1998.
- Sherriff FE and Henderson Z.** Cholinergic neurons in the ventral trapezoid nucleus project to the cochlear nuclei in the rat. *Neuroscience* 58: 3: 627–633, 1994.
- Slemmon JR, Danho W, Hempstead JL and Morgan JL.** Cerebellin: a quantifiable marker for Purkinje cell maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 20: 7145–7148, 1985.
- Slemmon JR, Goldowitz D, Blacher R and Morgan JL.** Evidence for the transneuronal regulation of cerebellin biosynthesis in developing Purkinje cells. *J Neurosci* 8: 12: 4603–4611, 1988.
- Smetters D, Majewska A and Yuste R.** Detecting action potentials in neuronal populations with calcium imaging. *Methods* 18: 2: 215–221, 1999.
- Smith PH, Joris PX, Carney LH and Yin TC.** Projections of physiologically characterized globular bushy cell axons from the cochlear nucleus of the cat. *J Comp Neurol* 304: 3: 387–407, 1991.
- Smith PH, Joris PX and Yin TC.** Projections of physiologically characterized spherical bushy cell axons from the cochlear nucleus of the cat: evidence for delay lines to the medial superior olive. *J Comp Neurol* 331: 2: 245–260, 1993.
- Spatz WB.** Purkinje-like cells in the cochlear nucleus of the Common Tree Shrew (*Tupaia glis*) identified by calbindin immunohistochemistry. *Brain Res* 983: 1–2: 230–232, 2003.
- Spatz WB.** Differences between guinea pig and rat in the dorsal cochlear nucleus: expression of calcium-binding proteins by cartwheel and Purkinje-like cells. *Hear Res* 107: 1–2: 136–146, 1997.
- Spirou GA, Davis KA, Nelken I and Young ED.** Spectral integration by type II interneurons in dorsal cochlear nucleus. *J Neurophysiol* 82: 2: 648–663, 1999.
- Spirou GA and Young ED.** Organization of dorsal cochlear nucleus type IV unit response maps and their relationship to activation by bandlimited noise. *J Neurophysiol* 66: 5: 1750–1768, 1991.
- Steriade M.** Acetylcholine systems and rhythmic activities during the waking–sleep cycle. *Prog Brain Res* 145: 179–196, 2004.
- Steriade M, Pare D, Parent A and Smith Y.** Projections of cholinergic and non-cholinergic neurons of the brainstem core to relay and associational thalamic nuclei in the cat and macaque monkey. *Neuroscience* 25: 1: 47–67, 1988.
- Szentágothai J and Réthelyi M.** *Funkcionális anatómia*. Medicina, 2006.
- Takahashi N, Sasaki T, Usami A, Matsuki N and Ikegaya Y.** Watching neuronal circuit dynamics through functional multineuron calcium imaging (fMCI). *Neurosci Res* 58: 3: 219–225, 2007.
- Usami A, Matsuki N and Ikegaya Y.** Spontaneous plasticity of multineuronal activity patterns in activated hippocampal networks. *Neural Plast* 2008: 108969, 2008.
- Voigt HF and Young ED.** Cross-correlation analysis of inhibitory interactions in dorsal cochlear nucleus. *J Neurophysiol* 64: 5: 1590–1610, 1990.

- Watanabe M and Kano M.** Climbing fiber synapse elimination in cerebellar Purkinje cells. *Eur J Neurosci* 34: 10: 1697–1710, 2011.
- Weedman DL and Ryugo DK.** Projections from auditory cortex to the cochlear nucleus in rats: synapses on granule cell dendrites. *J Comp Neurol* 371: 2: 311–324, 1996.
- Weight FF and Votava J.** Slow synaptic excitation in sympathetic ganglion cells: evidence for synaptic inactivation of potassium conductance. *Science* 170: 3959: 755–758, 1970.
- Weinberg RJ and Rustioni A.** A cuneocochlear pathway in the rat. *Neuroscience* 20: 1: 209–219, 1987.
- Wenzel GI, Pikkula B, Choi CH, Anvari B and Oghalai JS.** Laser irradiation of the guinea pig basilar membrane. *Lasers Surg Med* 35: 3: 174–180, 2004.
- Wiedenmann B and Franke WW.** Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* 41: 3: 1017–1028, 1985.
- Williams SR, Christensen SR, Stuart GJ and Hausser M.** Membrane potential bistability is controlled by the hyperpolarization-activated current I(H) in rat cerebellar Purkinje neurons in vitro. *J Physiol* 539: Pt 2: 469–483, 2002.
- Winn P.** How best to consider the structure and function of the pedunculopontine tegmental nucleus: evidence from animal studies. *J Neurol Sci* 248: 1–2: 234–250, 2006.
- Xu L and Middlebrooks JC.** Individual differences in external-ear transfer functions of cats. *J Acoust Soc Am* 107: 3: 1451–1459, 2000.
- Yao W and Godfrey DA.** Immunolocalization of alpha4 and alpha7 subunits of nicotinic receptor in rat cochlear nucleus. *Hear Res* 128: 1–2: 97–102, 1999a.
- Yao W and Godfrey DA.** Vesicular acetylcholine transporter in the rat cochlear nucleus: an immunohistochemical study. *J Histochem Cytochem* 47: 1: 83–90, 1999b.
- Yao W and Godfrey DA.** Immunohistochemistry of muscarinic acetylcholine receptors in rat cochlear nucleus. *Hear Res* 89: 1–2: 76–85, 1995.
- Yeomans JS, Lee J, Yeomans MH, Steidl S and Li L.** Midbrain pathways for prepulse inhibition and startle activation in rat. *Neuroscience* 142: 4: 921–929, 2006.
- Young ED and Brownell WE.** Responses to tones and noise of single cells in dorsal cochlear nucleus of unanesthetized cats. *J Neurophysiol* 39: 2: 282–300, 1976.
- Yuste R and Katz LC.** Control of postsynaptic Ca²⁺ influx in developing neocortex by excitatory and inhibitory neurotransmitters. *Neuron* 6: 3: 333–344, 1991.
- Yuzaki M.** Cbln and C1q family proteins: new transneuronal cytokines. *Cell Mol Life Sci* 65: 11: 1698–1705, 2008.
- Zdebik AA, Wangemann P and Jentsch TJ.** Potassium ion movement in the inner ear: insights from genetic disease and mouse models. *Physiology (Bethesda)* 24: 307–316, 2009.
- Zhan X, Pongstaporn T and Ryugo DK.** Projections of the second cervical dorsal root ganglion to the cochlear nucleus in rats. *J Comp Neurol* 496: 3: 335–348, 2006.
- Zhang JS and Kaltenbach JA.** Modulation of spontaneous activity by acetylcholine receptors in the rat dorsal cochlear nucleus in vivo. *Hear Res* 140: 1–2: 7–17, 2000.
- Zheng J, Shen W, He DZ, Long KB, Madison LD and Dallos P.** Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature* 405: 6783: 149–155, 2000.

Közzelvények listája



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK/304/2012.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Kőszeghy Áron

Neptun kód: KK87CN

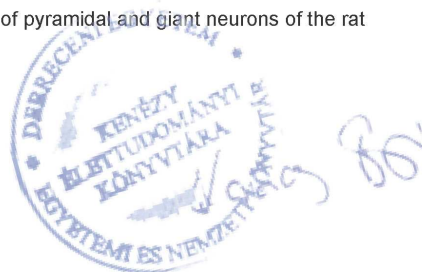
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kőszeghy, Á.**, Vincze, J., Rusznák, Z., Fu, Y., Paxinos, G., Csernoch, L., Szűcs, G.: Activation of muscarinic receptors increases the activity of the granule neurones of the rat dorsal cochlear nucleus: A calcium imaging study.
Pflugers Arch. 463 (6), 829-844, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-012-1103-1>
IF:4.463 (2011)
2. **Kőszeghy, Á.**, Pál, B., Pap, P., Pocsai, K., Nagy, Z., Szűcs, G., Rusznák, Z.: Purkinje-like cells of the rat cochlear nucleus: A combined functional and morphological study.
Brain Res. 1297, 57-69, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2009.08.041>
IF:2.463

További Közlemények

3. Kecskés, S., **Kőszeghy, Á.**, Szűcs, G., Rusznák, Z., Matesz, K., Birinyi, A.: Three-dimensional reconstruction and quantitative morphometric analysis of pyramidal and giant neurons of the rat dorsal cochlear nucleus.
Brain Struct. Funct. Epub ahead of Print (2012)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00429-012-0457-7>
IF:5.628 (2011)



4. Lontay, B., Pál, B., Serfőző, Z., **Kőszeghy, Á.**, Szűcs, G., Rusznák, Z., Erdődi, F.: Protein phosphatase-1M and Rho-kinase affect exocytosis from cortical synaptosomes and influence neurotransmission at a glutamatergic giant synapse of the rat auditory system.
J. Neurochem. Epub ahead of print (2012)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07882.x>
IF:4.061 (2011)

5. Pál, B., **Kőszeghy, Á.**, Pap, P., Bakondi, G., Pocsai, K., Szűcs, G., Rusznák, Z.: Targets, receptors and effects of muscarinic neuromodulation on giant neurones of the rat dorsal cochlear nucleus.
Eur. J. Neurosci. 30 (5), 769-782, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06868.x>
IF:3.418

6. Pap, P., **Kőszeghy, Á.**, Szűcs, G., Rusznák, Z.: Cytoplasmic Ca²⁺ concentration changes evoked by cholinergic stimulation in primary astrocyte cultures prepared from the rat cochlear nucleus.
Hear. Res. 255 (1-2), 73-83, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.heares.2009.05.006>
IF:2.177

Összesített impakt faktor: 22.21

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 6.926

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.10.17



Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Csernoch László Professzor Úrnak, a DE-OEC Élettani Intézet igazgatójának, amiért támogatott, és lehetővé tette PhD munkám elvégzését az Intézetben.

Köszönöm a munkám során nyújtott útmutatást témavezetőmnek, Rusznák Zoltánnak és a Neurobiológiai Munkacsoport vezetőjének, Szűcs Géza Professzor Úrnak. Hálás köszönet Pál Balázsnak, aki segítségemre volt a munkámhoz szükséges elméleti és gyakorlati ismeretek elsajátításában, és akihez mindig fordulhattam kérdéseimmel. Köszönettel tartozom közvetlen munkatársaimnak és külföldi kollaborációs partnereinknek: George Paxinosnak, Yuhong Funak, Vargáné Kiss Ibolyának, Pocsai Krisztinának, Bakondi Gábornak, Kosztka Líviának, Pap Pálnak, Nagy Dénesnek, Nagy Zsuzsannának és Vincze Jánosnak.

Ezúton szeretném kifejezni hálámat az Intézet összes dolgozójának, akik barátságos és segítőkész légkört teremtettek, ami megkönnyítette a munkámat.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családomnak és páromnak, hogy stabil érzelmi háttérrel biztosítottak, és minden lehetséges módon támogattak a PhD munkám elvégzése során.

A doktori képzési programot a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 sz. projekt támogatta. A kísérletes munka kivitelezéséhez az OTKA NK-61412; OTKA K-72812 és a 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0025 sz. projekt nyújtott támogatást. A projektek az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósultak meg.



SZÉCHENYI TERV