

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A nucleus pedunculo pontinus kolinerg neuronjai, mint az orexinerg neuromoduláció
célpontjai**

Dr. Baksa Brigitta

Témavezető: Dr. Pál Balázs Zoltán



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2020

1. TARTALOMJEGYZÉK

1. TARTALOMJEGYZÉK.....	2
2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
3. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
3.1. A nucleus pedunculo-pontinus	7
3.1.1 A nucleus pedunculo-pontinus (PPN) anatómiája	7
3.1.2 A PPN sejtípusai	8
3.1.3. A PPN szinaptikus kapcsolatai	11
3.1.4. A PPN élettani szerepe.....	13
3.1.5. A középagy és a bazális előagy más kolinerg struktúrái	18
3.1.6. A PPN neuronok funkcionális csoportosítása.....	19
3.2. Az asztrocita-neuron kommunikáció elektrofiziológiai jellemzői	24
3.2.1. A neuronális excitabilitást fokozó asztrocita-függő áramok	27
3.2.2. Az extraszinaptikus glutamát és hozzájárulása az alvás-ébrenlét szabályozáshoz	31
3.2.3. A PPN SIC-einek sajátosságai és a rajtuk érvényesülő neuromodulációs hatások	33
3.3. Az orexinerg neuromoduláció.....	37
3.3.1. Az orexin élettani és kórélettani szerepei.....	38
4. CÉLKITŰZÉSEK	41
5. ESZKÖZÖK ÉS MÓDSZEREK	42
5.1. Oldatok, vegyszerek	42
5.2. Állatok, preparálás	43
5.3. Elektrofiziológiai mérések.....	44
5.4. A neuronok rekonstrukciója	48
5.5. Kolin acetiltranszferáz immunhisztokémia	49
6. EREDMÉNYEK.....	50
6.1. A PPN kolinerg neuronok funkcionális alcsoportjainak vizsgálata	50
6.1.1. A kolinerg neuronok azonosítása	50
6.1.2. A kolinerg neuronok morfológiai elemzése	51
6.1.3. Neuronok csoportosítása <i>in vitro</i> funkcionális tulajdonságok alapján.....	54
6.1.4. Korai és késői tüzelésű neuronok a PPN-ben.....	62
6.1.5. Magas küszöbű membránpotenciál-oscillációk.....	64
6.2. A PPN orexinerg neuromodulációjának asztrocitafüggő komponense.....	69

6.2.1. Az orexin hatása a tónusos áramokra, EPSC-kre és az alacsony küszöbű oszcillációs aktivitásra	69
7. MEGBESZÉLÉS	75
7.1. A PPN kolinerg neuronok funkcionális csoportosítása	75
7.1.1. A kolinerg neuronok neurokémiai azonosítása	76
7.1.2. „Klasszikus” funkcionális alcsoportok a PPN kolinerg neuronjain belül	77
7.1.3. Korai és késői tüzlésű kolinerg neuronok a PPN-ben	79
7.1.4. Magas küszöbű membránpotenciál oszcillációk	80
7.1.5. A neuronok funkcionális tulajdonságainak topográfiai különbségei.....	82
7.2. A PPN-re ható orexinerg neuromodulációs hatások vizsgálata	84
8. ÖSSZEFOGLALÁS	86
9. SUMMARY	87
10. IRODALOMJEGYZÉK.....	88
11. TÁRGYSZAVAK.....	108
12. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA.....	109
13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	109

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

aCSF	mesterséges agy-gerincvelői folyadék
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-ixoxazolpropionsav
Arc	nucleus arcuatus
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
BAT	barna zsírszövet
bNOS	nitrogén monoxid szintetáz
BST	"bed nucleus of stria terminalis"
CB1	1-es típusú kannabinoid receptor
ChAT	cholin acetiltranszferáz
ChR2	channelrhodopsin-2
CnF	nucleus cuneiformis
DA	dopamin
D-AP5	D-(-)-2-amino-5-foszfonopentanoát
DR	nucleus raphe dorsalis
EAAT1,2	serkentő aminosav transzporter 1,2 ("excitatory amino acid transporter")
ECM	extracelluláris mátrix
EEG	elektroencefalográfia
EPSC	serkentő poszt-szinaptikus áram ("excitatory postsynaptic current")
GABA	gamma-amino-vajsav (gamma-amino butyric acid")
GAD	glutamát dekarboxiláz
GFAP	gliális fibrilláris savas fehérje ("glial fibrillary acidic protein")
GLT1	1-es típusú glutamát transzporter
GluN2B	NMDA receptor alegység
GPR55	G-fehérje kapcsolt kannabinoid receptor
HA	hisztamin
hdb	nucleus striae diagonalis horizontalis
HEPES	4-(2-hidroxietyl)-1-piperzeinetán-szulfonsav
HTO	magas küszöbű membránpotenciál oszcillációk ("high threshold oscillation")
Il1	interleukin 1
IPSC	gátló postsynapticus áram ("inhibitory postsynaptic current")

KCNQ	Kv7 feszültségfüggő kálium csatorna alternatív elnevezése
LC	locus coeruleus
LDT	nucleus laterodorsalis tegmentalis
LHA	lateralis hypothalamicus area
ll	lemniscus lateralis
LTS	alacsony küszöbű (kalcium)tüskék ("low threshold spike")
M1, 3, 5	1-es, 3-as, 5-ös típusú muszkarinos acetil-kolin receptor
MCH	melanin koncentráló hormon
mEPSC	miniatúr serkentő posztzinaptikus áram
mGluR	metabotróp glutamát receptor
ms	nucleus septalis medialis
NA	noradrenalin
NAc	nucleus accumbens
NADPH	nikotinamid- adenin- dinukleotid- foszfát hidrogén
NBQX	2,3-dihidroxi-6-nitro-7szulfamoil-benzo[f]quinoxalin
NMDA	N-metil-D-aspartát
NPY	neuropeptid Y
NREM	szemmozgás nélküli alvási fázis ("non- rapid eye movement")
OXR1,2	1-es és 2-es orexin receptor
P2X	2X típusú purinoreceptor
P2Y	2Y típusú purinoreceptor
PAG	periaqueductalis szürke állomány ("periaqueductal gray matter")
PAR1	1-es típusú proteáz aktiválta receptor
PB	nucleus parabrachialis
PGE ₂	E ₂ típusú prosztaglandin receptor
POA	area preoptica
POMC	proopiomelanocortin
PPN	nucleus pedunculopontinus
RAS	retikuláris aktivációs rendszer
REM	gyors szemmozgás ("rapid eye movement")
SCN	nucleus suprachiasmaticus
scp	pedunculus cerebellaris superior

sEPSC	spontán serkentő posztszinaptikus áram
si	substantia innominata
SIC	lassú befelé irányuló áram ("slow inward current")
SN	substantia nigra
SWA	lassú hullámú aktivitás ("slow wave activity")
TBOA	threo-beta-benziloxyl aszpartát
TBS	Tris-pufferolt sóoldat
TMN	nucleus tuberomamillaris
TNF α	tumor nekrosis faktor α
TTX	tetrodotoxin
VACHT	vezikuláris acetil-kolin transzporter
vdb	nucleus striae diagonalis verticalis
VGluT2	2-es típusú vezikuláris glutamát transzporter
VLPO	nucleus preopticus ventrolateralis
VRAC	volumenregulált anioncsatorna
VTA	area tegmentalis ventralis
WIN55,212-2	(R)-(+)-[2,3-dihidro-5-metil-3[(4-morfolinil)metil]pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazinil]-(1-naftalenil)methanone mesylat

3. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

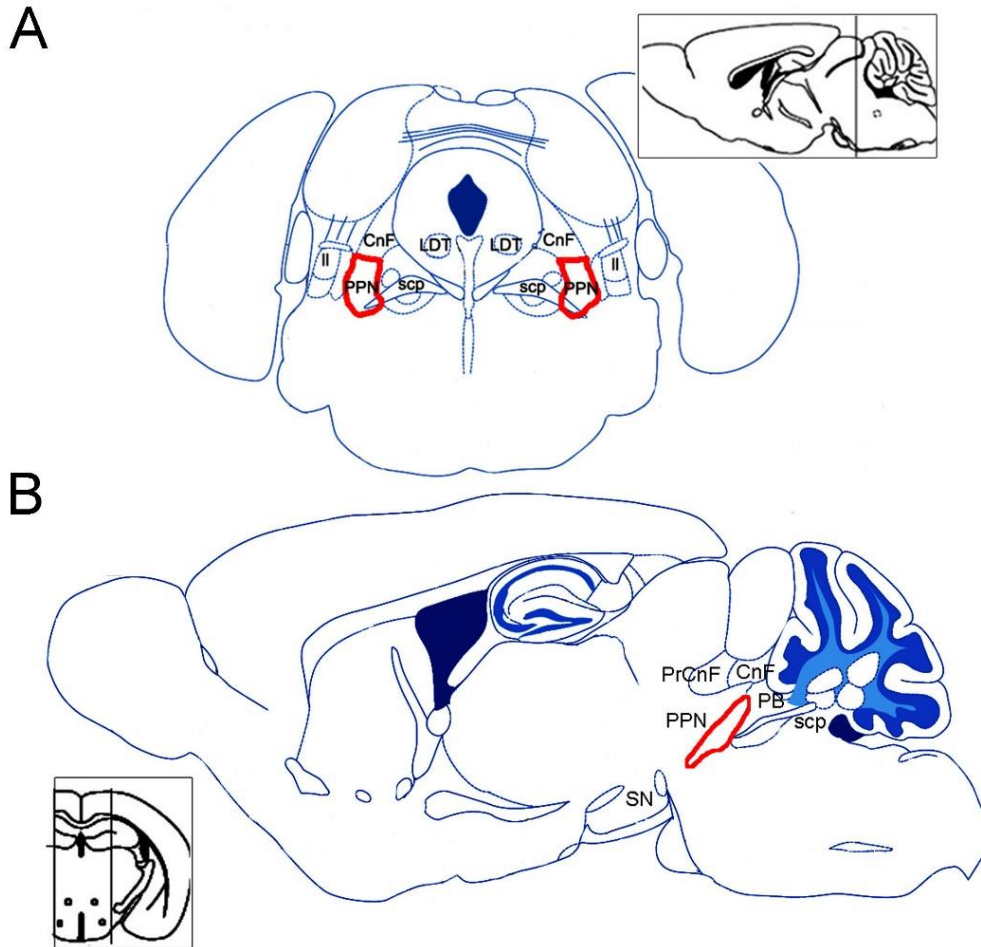
3.1. A nucleus pedunculopontinus

3.1.1 A nucleus pedunculopontinus (PPN) anatómiája

A nucleus pedunculopontinus (PPN) a középagyban, a tegmentumban elhelyezkedő hosszúkás, rostrocaudalisán elnyúló struktúra (1. ábra), melynek határai a következők:

- medialis határa a pedunculus cerebellaris superior, bár egyes esetekben a pedunculus cerebellaris superiorba is benyúlik a mag, vagy attól ventromedialisán is elhelyezkedik
- lateralis határa a lemniscus lateralis
- rostralis határa a substantia nigra posterolateralis része
- caudalisán a nucleus parabrachialis határolja
- dorsalis határa a nucleus cuneiformis és precuneiformis

A PPN-t klasszikusan két részre szokták osztani, amelyek egymástól nemcsak elhelyezkedésben, hanem a kolinerg neuronok sűrűsége alapján is elkülönül. Ez a két terület a pars compacta és a pars dissipata. A pars compacta a PPN caudalis területe, míg a pars dissipata a PPN rostralis területének felel meg (Mena-Segovia és Bolam, 2017). A középagyban kolinerg neuronok laza, pontos határokkal nem rendelkező magvakat alkotnak, ahol a dendritek átnyúlnak a szomszédos magok területére. A középagyban jellemzően két területen csoportosulnak kolinerg neuronok, melyek közül az egyik legfőbb terület a PPN, a másik a nucleus laterodorsalis tegmentalis (LDT). Humán középagyban nagyon sok az átfedés a PPN elülső része és a substantia nigra posterior része között; csakúgy, mint a locus coeruleus, a medialis PPN és az LDT lateralis része között. Funkcionális átfedések van a PPN és a nucleus cuneiformis glutamaterg neuronpopulációi között (saját, nem közölt adatok).



1. ábra. A nucleus pedunculopontinus elhelyezkedése a Paxinos-atlasz (Paxinos és Franklin, 2013) alapján. A. Coronalis metszet. B. Parasagittalis metszet. PPN: nucleus pedunculopontinus, pirossal jelölt terület; CnF: nucleus cuneiformis; LDT: nucleus laterodorsalis tegmentalis; SN: substantia nigra; PB: nucleus parabrachialis; scp: pedunculus cerebellaris superior; II: lemniscus lateralis.

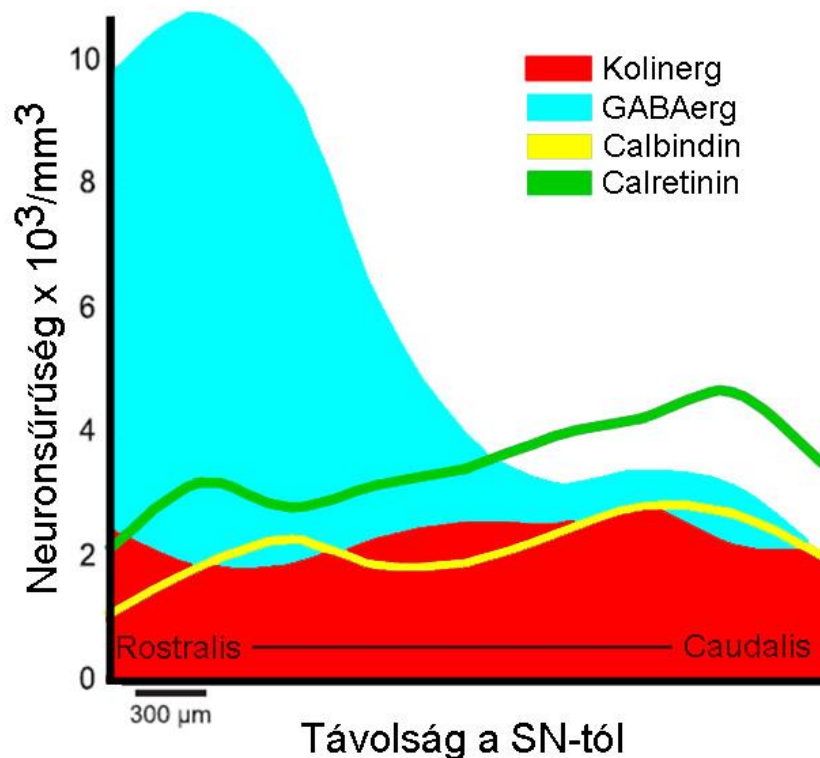
3.1.2 A PPN sejtípusai

A PPN-t morfológiailag és funkcionálisan heterogén struktúrának tarthatjuk. Különböző méretű szómával és dendritfával rendelkező neuronok találhatók benne, valamint különböző neurokémiai tulajdonsággal rendelkező neuronok alkotják a sejtsoportosulást (Martinez-Gonzalez és mtsai. 2009; Wang és Morales, 2009). A PPN-t bár kolinerg magként ismerjük (kb. 3000 kolinerg neuronja van), azonban nem-kolinerg (GABAerg, glutamaterg) neuronokat is tartalmaz nagy számban (Benarroch, 2013; Martinez-Gonzalez és mtsai. 2012).

Ezen neuronok aránya a magon belül változik a rostrocaudalis tengely mentén (Mena-Segovia és mtsai. 2009; Wang és Morales, 2009). A rostralis területen kevesebb számú kolinerg neuron található, és a caudalis terület felé jelentősen nő a számuk. Míg ezek a kolinerg neuronok a PPN határát meghatározzák, a GABAerg és glutamaterg neuronok kapcsolata a PPN határaival való kapcsolata nem egyértelmű. A rostralis PPN nagyszámú GABAerg neuronja a substantia nigra pars reticularisában lévő GABAerg neuronokkal és a nucleus tegmentalis rostromedialis területével alkotnak átfedő populációt (Mena-Segovia és mtsai. 2009). A glutamaterg neuronok sűrűn helyezkednek el a caudalis PPN-ben, és a nucleus cuneiformissal hoznak létre egy dinamikus átmenetet alkotó neuroncsoportot.

A kolinerg neuronok átmérője 20-30 μm közöttiek, fajtól függetlenül, de egyes szerzők ettől kisebb és nagyobb (15-80 μm) átmérőjű neuronokat is leírtak. Formájukat tekintve leírtak kerek, ovális, és háromszög alakú sejttesteket is (Reese és mtsai. 1995).

A PPN egyes neurontípusai különböző sűrűségben és arányban helyezkednek el a rostrocaudalis tengely mentén (2. ábra, Martinez-Gonzalez és mtsai. 2011). A GABAerg neuronok jóval sűrűbben helyezkednek el a PPN rostralis területén, mint a kolinerg vagy a glutamaterg neuronok. A PPN rostralis határától 1,2 - 1,5 mm-re caudalisan számuk drámai csökkenést mutat. A kolinerg neuronok rétegszerűen helyezkednek el a substantia nigrához közeli területeken, majd a GABAerg neuronok számának csökkenésével párhuzamosan a kolinerg sejtek száma megnő, és egymással összekeveredve helyezkednek el. Caudalis irányba továbbhaladva a kolinerg neuronok száma nem mutat olyan drasztikus csökkenést, mint a GABAerg neuronoké. A glutamaterg neuronok esetében a számuk a caudalis PPN-ben nagyobb, mint rostralisán (Wang és Morales 2009).



2. ábra. A különböző neurokémiai tulajdonságokkal rendelkező PPN neuronok eloszlása a rostrocaudalis tengely mentén (Martinez-Gonzalez és mtsai. 2011 alapján). SN: substantia nigra

A sejtek neurokémiai markerei alapján a fő neurontípusokon belül különböző alcsoportokat lehet kimutatni (Fortin és Parent, 1999; Dun és mtsai. 1995).

A különböző neuron alpopulációk vizsgálatához jó támpontot adhat az, hogy a különböző funkcionális tulajdonságokkal rendelkező neuronok különböző markerekkel bírnak. Például az agy különböző területein levő neuronok (mint a hippocampus, cortex, vagy basalis ganglion neuronjai) többféle kalciumkötő fehérjét fejeznek ki. Ilyen kalciumkötő fehérjék -a parvalbumin, calbindin vagy calretinin- a PPN-ben is jelen vannak (Dun és mtsai. 1995), melyeket leginkább a GABAerg és a glutamaterg neuronok expresszálnak, így elsősorban azok alpopulációinak vizsgálatára szolgálnak. Parvalbumint mindössze néhány sejt fejez ki, calbindint és calretinint azonban jóval többen, sőt ezek megoszlása a PPN rostrocaudalis tengelye mentén történik (2. ábra). A kolinerg neuronok csak kevés százalékát fejezi ki a kalciumkötő fehérjéket. Calretinint néhány kolinerg esetben mutattak ki, míg calbindint egy esetben sem. Calbindint és calretinint kifejező neuronok közül GABAerg sejtek nagyobb számban a PPN rostralis területén találhatóak, míg a glutamaterg sejtek inkább a PPN caudalis területén (Martinez Gonzalez és mtsai. 2012, 2009). Ezek alapján a kolinerg, GABAerg és

glutamaterg idegsejteket új alcsoportokba lehet sorolni a kalciumkötő fehérjék expressziója alapján, mely további funkcionális összetettségre utal (Martinez-Gonzalez és mtsai. 2012). Más neuropeptidok, például galanin jelenléte szintén alapul szolgálhat alcsoportok létrehozásához. A galanin expressziója ezenkívül a substantia nigra léziója esetén a rostrocaudalis tengely mentén változtatja eloszlását (Elson és mtsai. 2018). Egy további, a PPN-ben jelen levő neuropeptid, az urotenzin II is fontos markerként ismert; amellett, hogy a kolinerg neuronokra kifejtett, a REM alvás modulációjában kifejtett szerepe is ismert (Huitron-Resendiz és mtsai. 2005).

3.1.3. A PPN szinaptikus kapcsolatai

A PPN bemenetei számos agyterületről erednek. A mag bementet kap a gerincevelőből, a colliculus superiorból, a nucleus propositus hypoglossi-ból, a nucleus entopeduncularisból, a nucleus subthalamicusból, a substantia nigra pars reticularisából és a cortexből (1. táblázat; Reese és mtsai. 1995).

A PPN neuronok axonjainak lefutása, kollaterálisainak száma jelentősen különbözik a kolinerg és nem-kolinerg neuronok esetén. A PPN kolinerg neuronjainak számájából eredő axonok átlagosan 5 kollateralist adnak, melynek többsége felszálló pályát ad, és követik a dorsalis és ventralis felszálló pályákat (Mena-Segovia és mtsai. 2008b). A felszálló ventralis pálya innerválja a középagyú basalis ganglionok területét, a bazális előagy hypothalamicus régiójában folytatódik. A kolinerg axonok által kialakított szinapszisokat a substantia nigra pars compacta területén (Bolam és mtsai. 1991; Clarke és mtsai. 1987), az area tegmentalis ventralis területén (Oakman és mtsai. 1995) és a nucleus subthalamicus területén (Bevan és Bolam, 1995) azonosították. Ezekon felül kolinerg neuronok axonjait találták a substantia nigra pars reticularisban (Saper és Loewy, 1982), a lateralis hypothalamusban, a ventralis pallidumban (Woolf és Butcher, 1986), amygdalában, és a mediolateralis septumban (Dautan és mtsai. 2016a; 2016b). A felszálló dorsalis pálya a colliculus inferiorra és superiorra, valamint a thalamust idegzi be. Szinaptikus kapcsolatokat írtak le a colliculus superior, a nucleus parafascicularis, nucleus thalamicus reticularis és anterior thalamus területén. Retrográd és anterográd tracer tanulmányok azonosítottak kapcsolatokat a colliculus inferiorral (Motts és Schofield, 2009) és az összes főbb motoros, szenzoros, asszociatív és limbikus thalamikus maggal (Paré és mtsai. 1988; Smith és mtsai. 1988, Steriade és mtsai. 1988).

Egy vagy két kollateralisból származó leszálló axonális pályákat is leírtak, melyek innerválják a nucleus pontis oralist és caudalist (Mena-Segovia és mtsai. 2008b). A nucleus gigantocellularisnak egy kevésbé kifejezett bemenet adnak, valamint egyes szerzők szerint a gerincvelőt is innerválják (Rye és mtsai. 1988; Spann és Grofova, 1989). A kolinerg neuronok axonjai tehát nagy mértékben kollateralizáltak és kiterjedt kapcsolatokkal innerválják a különböző közepagi, előagi és alsó agytörzsi struktúrákat.

A PPN rostralis területéről származó kolinerg rostok elsősorban a lateralisán elhelyezkedő motoros struktúrákat innerválják, mint a substantia nigra pars compacta vagy a dorsolateralis striatum területe, a PPN caudalis területének rostjai pedig a medialisán elhelyezkedő limbikus struktúrákat látják el rostokkal, mint az area tementalis ventralis, és a dorsomedialis striatum (Dautan és mtsai. 2014, 2016a; 2016b).

A PPN nem-kolinerg neuronjaiak kapcsolatairól kevesebbet tudunk. Az axonjaik kevésbé komplexebbek, és kevésbé kiterjedtebbek (Mena-Segovia és mtsai. 2008b). A nem-kolinerg neuronok átlagosan 2 axon kollateralissal rendelkeznek, amelynek pályái a közepagyra és a caudalis agytörzsi struktúrákra korlátozódnak. Egyes esetekben a nem-kolinerg neuronok szelektív beidegzést biztosítanak a basalis ganglion strukturájához (Ros és mtsai. 2010).

Glutamaterg projekciókat találtak a PPN-ből a substantia nigra pars compacta, az area tementalis ventralis (Charara és mtsai. 1996), a nucleus subthalamicus (Bevan és Bolam, 1995), és a thalamus felé (Barroso-Chinea és mtsai. 2011). A GABAerg neuronok a nucleus subthalamicusba (Bevan és Bolam, 1995) és hypothalamusba projiciálnak (Ford és mtsai. 1995). A bazális ganglionok egyes strukturáinak, a substantia nigra pars reticularisának és a globus pallidus pars interna beidegzése a rostralis PPN felől valószínűleg GABAerg neuronok által történik (Jackson és Crossman, 1983; Lavoie és Parent, 1994), bár a GABAerg neuronok posztzinaptikus céljai még nincsenek teljesen feltérképezve (1. táblázat). Mindhárom típusú neuron ad helyi axon kollateralisokat is és szinaptikus kapcsolatokat, azonban a kolinerg neuronok adnak a legtöbbet. A PPN-en belüli kollateralisok jelenléte egy komplex helyi szabályozásra utalnak, melyen belül a kolinerg neuronoké a legfontosabb.

3.1.4. A PPN élettani szerepe

3.1.4.1. A PPN szerepe az alvás-ébrenlét szabályozásában

A retikuláris aktivációs rendszert (RAS) az 1940-es években fedezték fel, mint az ébrenlétet döntően meghatározó struktúrát. Kezdeti tanulmányaiban Moruzzi és Magoun bemutatták, hogy a formáció retikuláris elektromos ingerlése változásokat indukál az EEG kérgi aktivitásmintázatban (Moruzzi és Magoun, 1949). A stimuláció alatt a magas amplitúdójú lassú oszcillációs aktivitás alacsony amplitúdójú gyors oszcillációs aktivitásba, EEG deszinkronizációba ment át, ami az éberség és a kortikális aktiváció jellegzetes megjelenési formája. Úgy gondolták, hogy a RAS aktiválása szükséges ahhoz, hogy „felébressze” az agyat, míg inaktiválása pedig alvást indukál, illetve a RAS roncsolása kómát idéz elő (Lindsey és mtsai. 1949). A fentiek alapján arra lehetett következtetni, hogy a RAS elsődleges szerepe az ébrenléti állapotban lehet. Steriade és munkatársai (1991) bemutatták, hogy a RAS stimulációjából származó hatások legalább egy része kolinerg aktiváció következménye és a thalamus által mediált. A PPN (és vele együtt a másik mesopontin kolinerg struktúra, a nucleus laterodorsalis tegmentalis, LDT) számos thalamicus struktúrát innervál, az agykéregre és az ébrenlétre hatva ezen keresztül (Smith és mtsai. 1988; Steriade és mtsai. 1988). A PPN és az LDT neuronjai ébrenlét alatt és a REM alvás ideje alatt magasabb frekvenciával tüzelnek, mint lassú hullámú alvás alatt (Steriade és mtsai. 1988), demonstrálva, hogy RAS szerepet játszik a kortikális aktív állapot szabályozásában.

Bár a PPN kísérletes elektromos és farmakológiai stimulálása széles körben használatos a corticalis aktiváció gyors és hatékony befolyásolására, a PPN sérülései nem okoztak változásokat a teljes alvás-ébrenlét ciklusban (Deurveilher és Hennevin, 2001). Felmerül ennek alapján a kérdés, hogy mekkora szerepük van a kolinerg neuronoknak az ébrenlét kiváltásában és fenntartásában (Fuller és mtsai. 2011).

A PPN bemenetei	
	gerincvelő colliculus superior nucleus propositus hypoglossi nucleus entopeduncularis nucleus subthalamicus substantia nigra pars reticularis cortex
A PPN projekciói	
Kolinerg neuronok	
	Felszálló projekciók
	<hr/> <p><u>Dorsalis pálya</u></p> colliculus inferior colliculus superior thalamus (nucl. parafascicularis, nucl. reticularis, anterior thalamus) <p><u>Ventralis pálya</u></p> striatum (dorsomedialis, dorsolateralis) substantia nigra (pars compacta és reticularis) lateralis hypothalamus area tegmentalis ventralis nucleus subthalamicus ventralis pallidum amygdala mediolateralis septum
	Leszálló projekciók
	<hr/> nucleus pontis oralis, caudalis nucleus gigantocellularis gerincvelő
Nem-kolinerg neuronok	
	<p><u>Glutamaterg</u></p> bazális ganglionok substantia nigra pars compacta area tegmentalis ventralis nucleus subthalamicus thalamus <p><u>GABAerg</u></p> substantia nigra pars reticularis nucleus subthalamicus hypothalamus globus pallidus pars interna

1. táblázat. A PPN szinaptikus kapcsolatai.

In vivo kísérleti elrendezésben a PPN kolinerg neuronok patkányban alacsony frekvenciával tüzeltek (kb. 2 Hz) és aktivitásuk korrelált a kortikális aktivitás elektrofiziológiai jeleivel. A neuronok rekonstruálása után kiderült, hogy ezek a neuronok számos thalamicus projekcióval rendelkeznek (Mena-Segovia és mtsai. 2008b). Nem altatott patkányokban a PPN vagy az LDT kolinerg neuronjai magasabb tüzelési frekvenciával tüzeltek ébrenlét és REM alvás alatt, mint nem-REM alvás alatt. Átlagosan kb. 2 Hz volt a tüzelési frekvencia az aktív ébrenlét fázisában és kb. 1 Hz a csendes ébrenlét szakaszban (Boucetta és mtsai. 2014). A kolinerg neuronok aktivitása nem folyamatos, hanem inkább epizodikus jellegű (Boucetta és mtsai. 2014; Mena-Segovia és mtsai. 2008a), így nem valószínű, miszerint a tónusos aktivitás az ébrenlét fenntartásához szükséges, illetve azt, hogy a tónusos aktiváció gátlása elalváshoz vezet. A kolinerg neuronok tüzelési frekvenciája gyorsan és erőteljesen növekszik kortikális aktivációt kiváltó szenzoros stimuláció hatására, azaz különböző agyi aktivitástípusok közti átmenetek alatt (Petzold és mtsai. 2015). A stimulációra a kolinerg neuronok hamarabb adnak választ, mint ahogy ez EEG-n látható lenne, tehát a kolinerg neuronok aktivációja megelőzi a kortikális aktivitást. A kolinerg neuronok tüzelési frekvenciájának emelkedése csak átmeneti: az aktivitás fázisos csúcsát követően a tüzelési frekvencia visszatér az alap frekvenciára, annak ellenére, hogy a cortex aktivált állapotban maradt (Petzold és mtsai. 2015). A kolinerg neuronok aktivációjának átmeneti voltát az is mutatja, hogy a kolinerg neuronok magasabb tüzelési frekvencia adaptációs indexszel rendelkeznek (Bordás és mtsai. 2015; Petzold és mtsai. 2015). Ezt a folyamatot feltehetően az M-áram közvetíti, ami kontrollálja a neuronok ingerelhetőségét és meggátolja a neuron nagy frekvencián történő elhúzódó tüzelését. A magas tüzelési frekvenciát asztrocitafüggetlen és endokannabinoid mediált folyamatok is képesek kontroll alatt tartani (Kovács és mtsai. 2017).

A kolinerg neuronok REM alvás alatt is aktívak, és egy csoportjuk kifejezetten ezen agyi állapot alatt aktiválódik. A REM alvás alatt a kolinerg neuronok tüzelési frekvenciája magasabb, mint éberén (3 Hz) és állandó marad a REM alvási epizódok alatt (Boucetta és mtsai. 2014). A PPN vagy LDT kolinerg neuronjainak optogenetikai aktivációja REM alvást váltott ki az éppen alvó patkányok esetében, bár a kolinerg neuronok aktivációja nem tűnik szükségesnek ahhoz, hogy REM alvás alakuljon ki (Grace és mtsai. 2014). A PPN és LDT kolinerg bemenetet biztosít a nucleus subcoeruleusba, mely a REM alvás egyik legjellegzetesebb jelének, az izomtónus gátlásának szabályozását végzi (Vanni-Mercier és mtsai. 1989). A nem-kolinerg, azaz glutamaterg és GABAerg neuronok magasabb frekvenciával tüzeltek az ébrenlét és REM alvás fázisai alatt (Boucetta és mtsai. 2014), és a

kortikális lassú oszcillációk megjelenésével ugyancsak összefüggést mutattak (Mena-Segovia és mtsai. 2008b; Ros és mtsai. 2010). A kolinerg neuronokkal ellentétben, a glutamaterg neuronok egyes alpopulációi magas frekvenciával tüzelnek az ébrenlét vagy a REM alvás alatt (Boucetta és mtsai. 2014; Cox és mtsai. 2016). A PPN glutamaterg neuronjainak kemogenetikai aktivációja az ébrenlét elhúzódását váltja ki (Kroeger és mtsai. 2017).

A fentiek alapján valószínűnek látszik, hogy a PPN kolinerg és nem-kolinerg neuronjainak fiziológiai paraméterei és kapcsolatai szerepet játszhatnak a kérgi aktivációhoz és az ébrenléti állapotokhoz.

3.1.4.2. A PPN szerepe a szenzoros kapuzásban

A szenzoros kapuzást egy jól ismert és egyszerűen mérhető jelenséggel, a startle reflexszel és annak az ún. prepulzus gátlásával vizsgálhatjuk. A startle reflex egy hirtelen és erős, potenciálisan ártalmas reflexre adott gyors, motoros válasz (Koch, 1999). A kiváltó szenzoros stimulus alapján lehet akusztikus, taktilis vagy vesztibuláris (főemlősökben vizuális és halakban olfaktórius startle is létezik; Koch, 1999). A prepulzus gátlás a startle reflex amplitúdóját csökkentő hatás, amit egy, a startle stimulust közvetlenül megelőző, kisebb intenzitású stimulus vált ki (Koch, 1999; Yeomans és mtsai. 2006). Mind a startle reflex, mind a prepulzus gátlás jelentőségét az adja, hogy neurológiai, neuropszichiátriai betegségekben változásokat mutatnak (pl. a startle reflex amplitúdója jelentősen csökken progresszív szupranukleáris parézisben, a prepulzus gátlás csökkenése pedig a skizofrénia egyik fontos endofenotípusa; Yeomans és mtsai. 2006). A PPN nem szelektív lézióját vagy elektromos ingerlését végző tanulmányok arra a konklúzióra jutottak, hogy a mag a startle reflexben nem játszik közvetlen szerepet, viszont modulálja annak prepulzus gátlását (Koch és mtsai. 1993). Egy újabb, a kolinerg neuronokat szelektíven aktiválni képes optogenetikát használó tanulmány azonban azt mutatta ki, hogy a PPN kolinerg neuronok aktivációja a prepulzus gátlást nem befolyásolja, de a startle amplitúdóját növeli (Azzopardi és mtsai. 2018). A prepulzus gátlásra kifejtett hatásért feltehetően a nem-kolinerg neuronok aktivációja felelős.

3.1.4.3. A PPN funkcionális kapcsolata a motoros rendszerrel és a mozgásban betöltött szerepe

Ismert, hogy a PPN a mesencephalikus locomotor régió része. Az 1960-as években Shik és munkatársai (1966) bemutatták, hogy a pontomesencephalicus formatio reticularis stimulálása különböző mozgásmintázatokat alakított ki. Decerebrált macskák lépegető

mozgást végeznek a hídi formatio reticularis stimulálása következtében (Mori és mtsai. 1987), rámpa alakú elektromos stimuláció pedig mozgást váltott ki decerebrált patkányok esetében (Skinner és mtsai. 1990).

Az alsó agytörzsi motoros rendszerrel kapcsolatban levő, a PPN-ből eredő leszálló pályák kolinerg és feltehetően glutamaterg rostokat is tartalmaznak. A PPN leszálló pályái innerválják az agytörzsi nucleus pontis oralist és caudalist (Mena-Segovia és mtsai. 2008b), a nucleus gigantocellularis reticulospinalis neuronjait (Martinez-Gonzalez és mtsai. 2014), és a gerincvelőt (Spann és Grofova, 1989).

A kolinerg neuronok leszálló kollaterálisai olyan neuronokból származnak, melyeknek felszálló projekciói is vannak. Ugyanazon kolinerg neuronok, amelyek a thalamust innerválják, bemenetet biztosítanak a híd strukturái (mint pl. a nucleus pontis oralis) felé is (Mena-Segovia és mtsai. 2008b).

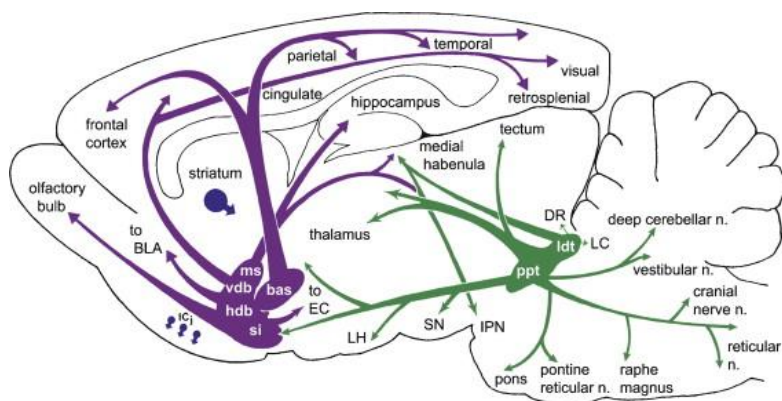
A GABAerg és glutamaterg neuronok kevés leszálló pályát képeznek, melyek közül egyesek leszálló axonjai csak az alsó agytörzsi motoros központja felé projiciálnak (Ros és mtsai. 2010). Elektrofiziológiai kísérletek feltételezik, hogy a kolinerg és glutamaterg neuronok aktivitása ellentétes mozgásmintázatot hoz létre. A PPN stimulálása az izomtónus atropinérzékeny csökkenését okozta, a nucleus oralis pontisban IPSP-k létrejöttét és a motoneuronok gátlását, mely feltételezi a motoros gátlás muszkarinos kolinerg gátlását (Takakusaki és mtsai. 2016). A nagyszámú glutamaterg neuront tartalmazó dorsalis PPN stimulálása hatására a nucleus pontis oralisban három komponensű mezőpotenciál keletkezett: gyors serkentő poszt-szinaptikus potenciál (EPSP), melyet egy gyors és egy késői, atropinérzékeny IPSP követett. Ez ellentétes a kolinerg neuronok nélküli nucleus cuneiformis stimulálása során kapott eredményekkel: a nucleus cuneiformis stimulálása a nucleus pontis oralisban csak EPSP létrejöttét váltotta ki, a motoneuronok aktivációja növekedett, az izomtónus fokozódott. A PPN kolinerg neuronjai a mozgást gátolják, és csökkentik az izomtónust, míg a glutamaterg neuronok a mozgást serkentik, valamint növelik az izomtónust (Mena-Segovia és Bolam, 2017).

3.1.5. A középagy és a bazális előagy más kolinerg struktúrái

Az emlősök agyának kolinerg rendszere számos fő sejtcsoportosulást és útvonalat tartalmaz. Ezek magukba foglalják a kolinerg motoneuronok széles skáláját a gerincvelő és az agytörzs területén, a mezopontin régióban lévő kolinerg neuroncsoportokat, egy kisebb csoportot a medialis habenulában, a bazális előagyban, a striatumban, bulbus olfactoriusban, és a Cajella complex szigeteiben. (3. ábra; Woolf és Butcher, 2011). Az agytörzsi és előagyi kolinerg struktúrákat 6 csoportba osztották, Ch1-Ch6 jelöléssel (Mesulam és mtsai.1984).

A PPN-től caudalisan elhelyezkedő, kolinerg neuronokban gazdag struktúra a nucleus laterodorsalis tegmentalis (LDT). Az LDT a PPN-nel együtt egymásban folytatódnak; a kolinerg neuronok populációja a substantia nigra caudalis végétől kezdődik, caudalis irányba terjedve átnyúlik a pedunculus cerebellaris superioron, és a nucleus laterodorsalis tegmentalis caudalis végénél végződik, ami a periaqueductalis szürkeállomány lateralis része és a IV. agykamra között fekszik. A nucleus laterodorsalis tegmentalis elsősorban a limbikus területeket idegzik be. A magcsoport kapcsolatai között leírták a thalamus (Cornwall és mtsai. 1990), nucleus accumbens (Dautan és mtsai. 2014), area tegmentalis ventralis (Oakman és mtsai. 1995), hypothalamus (Cornwall és mtsai. 1990), ventral pallidum, globus pallidus externalis, amygdala, colliculus inferior, dorsalis raphe területeit (Dautan és mtsai. 2016b).

A középagyi kolinerg magvakon kívül más kolinerg struktúrákat is ismerünk. Az agykéreg, az amygdala komplex, a hippocampalis formáció, a bulbus olfactorius és a thalamus egyes magjai kolinerg beidegződéseit elsősorban a bazális előagy és a középagyból kapja.



3. ábra. Bazális előagyi és agytörzsi kolinerg magcsoportok. Lila szín: bazális előagyi kolinerg magcsoportok (ms: nucleus septalis medialis; vdb: nucleus striae diagonalis verticalis; hdb: nucleus striae diagonalis horizontalis; si: substantia innominata). Zöld szín: a középagyi kolinerg struktúrák (ppt: nucleus pedunculopontinus; ldt: nucleus laterodorsalis tegmentalis; cranial nerve n.: V. VII. és a XII. agyideg motoros magvai, nucleus spinalis n. V. (Woolf és Butcher, 2011).

3.1.6. A PPN neuronok funkcionális csoportosítása

3.1.6.1. Cellularis szintű csoportosítás

A PPN neuronok membrántulajdonságai alapján a klasszikus leírások három féle típust tartanak számon. Ezen régi eredeti csoportosítások esetében a kolinerg neuronok azonosítása nem transzgén technikákkal, hanem a NADPH diaphoraz, a neuronális nitrogén-monoxid szintetáz (bNOS) és a kolin acetiltransferáz immunhisztokémiai azonosítását használták a neuronok kolinerg természetének alátámasztásához (Takasusaki és mtsai. 1996; Saitoh és mtsai. 2003). Későbbi tanulmányok is megerősítették, hogy a bNOS a kolinerg neuronok szelektív markere (Veleanu és mtsai. 2016).

A membránsajátságok alapján történő csoportosítás a korai tanulmányok alapján sok átfedést tartalmaz, de jelentős különbségek is megfigyelhetők. A csoportosítások alapját az alacsony kalciumtüskék és az A-áram jelenléte vagy hiánya adták.

Az alacsony küszöbű kalcium tüskék létrejöttéért alacsony küszöbű, gyorsan aktiválódó, gyorsan inaktiválódó kalciumáramok felelősek, jellegzetesen a T típusú kalciumáram. A hiperpolarizáció elmozdítja a T típusú kalcium áram inaktivációját, ezáltal kisebb depolarizáló impulzusok ki tudják váltani ennek az áramnak az aktivációját. Ha az LTS elég nagy amplitúdójú, akkor rövid időtartamú, de nagy frekvenciájú akciós potenciál sorozatok alakulnak ki hatására (burst tüzelés) (Shepherd, 2004).

Az A-áram egy tranziens, feszültségkapuzott káliumáram, melyről azt tudjuk, hogy az akciós potenciál késését okozza a depolarizáló stimulus kezdetéhez képest (Coetzee és mtsai. 1999; Kanold és Manis, 1999; Unal és mtsai. 2012). Az A-áramért felelős csatorna a Kv1.4, Kv3.4, Kv4.2 és Kv4.3 alegyégekből épül fel. Az A-áram legkönnyebben egy olyan depolarizáló impulzussal mérhető, melyet megelőz egy hiperpolarizáció, ami elmozdítja az áram inaktivációját (Coetzee és mtsai. 1999; Birnbaum és mtsai. 2004). Ha az A-árammal rendelkező neuronokat hiperpolarizáljuk, a stimulus kezdetéhez képest az akciós potenciál megjelenése késni fog. Az irodalmi adatok alapján az A-áram késési ideje 50 és 500 ms között változik (Miller és mtsai. 2008; Unal és mtsai. 2012).

Az eredeti csoportosítások ezekben a membrántulajdonágokban láttak különbséget, és a mai napig ezek használatosak az in vitro csoportosításhoz.

1. Kang és Kitai 1990-ben megjelent tanulmányuk szerint az I-es típusú neuron alacsony küszöbű kalciumtűskékkel ("low threshold spike", LTS), a II. típusú neuron A-árammal (tranziens kifelé irányuló áram) és alacsony küszöbű kalciumtűskékkel is rendelkezik. Létezik egy harmadik csoport, amelyek sem A-árammal, sem alacsony küszöbű kalciumtűskékkel nem rendelkeznek. Ezek a csoportok nem azonosak egy neurokémiai tulajdonsággal rendelkező sejtcsoporttal sem, ugyanis az I. és III. csoportba tartozó neuronok között nem találtak kolinerg (ChAT pozitív) neuronokat, míg a II. csoport 50%-a bizonyult kolinergnek.

2. Leonard és Llinas 1988-as tanulmánya szerint szintén három csoport létezik az elektrofiziológiai tulajdonságokat alapul véve. A szerzőpáros általi csoportosításban az első neuroncsoport nem volt képes önállóan spontánul tüzelni, hosszú akcióspotenciál-sorozatra azonban depolarizáló áramimpulzusok hatására képes volt. Ezeken a neuronokon előzetes hiperpolarizációt követő depolarizáció TTX-rezisztens kalciumkonduktanciát aktivált, ami alacsony küszöbű kalciumtűskéket és burst tüzelési mintázatot hozott létre. Ehhez hasonló alacsony küszöbű kalciumtűskékkel rendelkező neuronokat más területen is leírtak, pl a nucleus laterodorsalisban (Wilcox és mtsai. 1987). A második csoportba olyan neuronokat soroltak, melyek rendelkeztek A-árammal is, ami megakadályozza, hogy visszacsapó vagy ún. rebound" tüzelés alakuljon ki. Végül azok a neuronok, melyek rendelkeznek A-árammal, de jellemző rájuk az alacsony küszöbű kalciumtűske is, a harmadik csoportba tartoztak. Az I. csoportba tartozó neuronok 3%-a volt kolinerg, a II. csoport 75%-a, míg a III. csoport neuronjai között pedig 22% volt kolinerg típusú.

3. Takakusaki és munkatársai (1996) két csoportba sorolta a PPN neuronjait azok elektromos membrántulajdonságaikat alapul véve. Az első csoportba tartozó neuronok rendelkeztek alacsony küszöbű kalciumtűskékkel. A második csoport neuronjai rendelkeztek A-árammal, illetve ezen belül egy további alcsoportot különböztetett meg, melyek az A-áram mellett alacsony küszöbű kalciumtűskékkel is bírtak. Az I csoport sejtjeinek 0%-a bizonyult ChAT pozitívnak, míg a II csoport neuronjai között 54,4% ban fordultak elő kolinerg neuronok. Vizsgálataik szerint az I csoport neuronjai a PPN-ben szétszórta, míg a II csoport sejtjei inkább a PPN rostralis területén és a középső harmadában helyezkedtek el. (Takakusaki és mtsai. 1996)
4. Ye és munkatársai (2010) szintén létrehoztak egy csoportosítást, mely hasonlóan a fent megnevezett paramétereken alapult. Az I. típusba LTS-el rendelkező neuronokat sorolták, míg a II. típusba az A-árammal rendelkezőket csoportosították. A III. csoport tagjai mindkét, a IV. csoport tagjai egyik tulajdonsággal sem rendelkeztek (2. táblázat).

	I típus	Kolinerg sejtek aránya	II típus	II/2 típus	Kolinerg sejtek aránya	III típus	Kolinerg sejtek aránya	IIIK típus	IV típus
Kang és Kitai, 1990	LTS	0%	A-áram + LTS	-	50%	Ø A-áram, Ø LTS	0 %	-	-
Leonard és Llinas, 1988	LTS	3%	A-áram	-	75%	A-áram és LTS	22%	-	-
Takakusaki és mtsai. 1996	LTS	0%	A-áram	A-áram és LTS	54,4%	-	-	-	-
Ye és mtsai. 2010	LTS	-	A-áram	-	-	A-áram és LTS	-	-	Ø A-áram Ø LTS
Baksa és mtsai. 2019	LTS		A áram	-		A-áram és LTS		Ø A-áram Ø LTS	-

2. táblázat. A PPN neuronok membránsajátságok szerinti csoportosítása. (LTS = "low threshold spike", alacsony küszöbű kalciumtüske).

A PPN kolinerg neuronok egy funkcionális markere az ún. M-áram. A kolinerg neuronokon ez az áram mérhető, míg a nem-kolinerg típusú neuronokon nem láthatók (Bordás és mtsai. 2015). Az M-áram egy alacsony küszöbű, lassan aktiválódó, nem inaktiválódó feszültségfüggő káliumáram. Ez az áram képes szabályozni egyes perifériás vagy központi idegrendszeri neuronok ingerelhetőségét (Brown, 1988; Marrion, 1997). A neve onnan ered, hogy a muszkarinos acetilkolin receptor (M_1 , M_3 , M_5) aktiváció képes gátolni az áramot. Ezen felül más, G protein kapcsolt receptorok is képesek az áramot gátolni: 2-es típusú bradikinin, hisztamin, 1-es típusú angiotenzin, szerotonin (5HTC2) receptorok, (Brown, 1988), metabotróp glutamát receptorok (Charpak és mtsai.1990), purinerg (P2Y), P anyag, endokannabinoid (GPR55) vagy opioid receptorok (Moore és mtsai. 1994). Ezen felül a béta-adrenerg receptorok ellentétesen képesek befolyásolni a csatornát, elősegítve annak nyílását (Sims és mtsai. 1990). Az M áram képes szabályozni a neuronális ingerlékenységet, befolyásolja az akciós potenciálok közepes és lassú utóhiperpolarizációs szakaszát, meghatározza a depolarizáló impulzusok

hatására kialakított tüzelési frekvenciát, hozzájárul a tüzelési frekvencia adaptációjához, beállítja a nyugalmi membránpotenciált, és a szinaptikus vezikula felszabadulást. Az M áram hozzájárul a neuronális membránpotenciál oszcillációihoz. Az M áramért felelős csatorna a KCNQ vagy más néven Kv7 káliumcsatorna-család alegységeiből áll (Wang és mtsai. 1998, Selyanko és mtsai. 2002).

A PPN neuronok egyéb, a fenti csoportosításban nem használt elektrofiziológiai tulajdonságai között a magas küszöbű membránpotenciál-oszcillációkat ("high threshold oscillation", HTO) fontos megemlíteni. A jelenség első leírása Takakusaki és mtsai. (1996) nevéhez fűződik, de azóta több szerző is megerősítette a létezésüket (Kezunovic és mtsai. 2011; Bordás és mtsai. 2015). -20 mV körüli aktivációs küszöbvel rendelkeznek, a jelenséget P/Q és N-típusú kalciumáramok, valamint egyes káliumáramok aktivációja alakítja ki. A jelenséggel foglalkozó tanulmányok között fontos különbség, hogy míg Garcia-Rill munkacsoportja szerint minden PPN neuron sajátja (Kezunovic és mtsai. 2011), addig a mi munkacsoportunk kizárólag kolinerg neuronokon mutatta ki létezését (Bordás és mtsai. 2015).

3.1.6.2. *In vivo* elektrofiziológiai csoportosítás

A PPN kolinerg (és nem-kolinerg) neuronjainak egy másik csoportosítási lehetősége az *in vivo* tüzelési sajátságoknak és azoknak a corticalis aktivitással mutatott kapcsolatára alapuló csoportosítás.

Altatót patkányon a kolinerg neuronok két csoportját figyelték meg. A kortikális lassú hullámú aktivitás aktív szakaszai alatt és a gamma aktivitás alatt tüzel a kolinerg neuronok zöme. Ezen neuronok zömének a **tüzelési frekvenciája alacsony** (0,9 Hz). Egy további kisebb alpopulációjuk **magas akcióspotenciál-tüzelési frekvenciát** mutatnak (31 Hz) a lassú hullámú aktivitás passzív szakaszainak második felében tüzelnek és a gamma oszcillációktól nem függ a tüzelési aktivitásuk (Mena-Segovia és mtsai. 2008b).

A nem-kolinerg neuronok között háromféle alpopuláció különböztethető meg:

- a.) „**csendes**” **neuronok**, melyek csaknem teljesen csendesek a lassú hullámú aktivitás alatt (SWA), de frekvencianövekedéssel reagálnak a neocorticalis aktivációra.
- b.) „**tónusosan tüzelő**” **neuronok**, melyeknek állandó tüzelési frekvenciájuk van, ami független a neocorticalis szinkronizáció típusától, mértékétől.
- c.) „**szabálytalanul tüzelő**” **neuronok**, melyek a neocorticalis aktiváció alatt növelték vagy csökkentették a tüzelési frekvenciájukat (Ros és mtsai. 2010).

A PPN neuronokat az ébrenléttel, a REM- és non-REM alvással való kapcsolataik alapján is szokás csoportosítani. Ennek alapján elkülöníthetünk az ébrenlét és REM alvás alatt, csak REM alvás alatt és csak ébrenlét alatt aktív neuronokat (Boucetta és mtsai. 2014).

a.) **Az ébrenlét és REM alvás alatt aktív neuronok** maximális tüzelési frekvenciájukat az ébrenlét és a REM alvás alatt mutatták, míg a lassú hullámú alvás alatt jelentősen alacsonyabb frekvenciával tüzeltek. Ebben a csoportban a neuronok 21%-a volt kolinerg (vezikuláris acetilkolin transzporter pozitivitás alapján, VAcHT⁺), 17%-uk volt GABAerg neuron (glutamát dekarboxiláz pozitivitás alapján, GAD⁺), a maradék 62% glutamaterg neuronnak bizonyult (VAcHT⁻/GAD⁻/VGluT2⁺). Fontos megjegyezni, hogy a kolinerg neuronok mind ebben a csoportban voltak és 14,5 Hz alatti tüzelési frekvenciát mutattak. A **kolinerg neuronok** alacsonyabb frekvenciával tüzeltek az ébrenlét alatt, fokozatosan lassultak a csendes ébrenlét és a felületes lassú hullámú alvás alatt. A lassú hullámú alvás alatt nem mutattak akciós potenciál tüzelést. A REM alvás kezdetén fokozták a tüzelési frekvenciát, majd a REM alvás alatt maximális tüzelési frekvenciát mutattak. A **GABAerg neuronok** magasabb frekvenciával (nagyraészt 14,5 Hz felett) tüzeltek az ébrenlét alatt és a REM alvás alatt, mint a lassú hullámú alvás alatt. A **glutamaterg neuronok** ugyancsak szignifikánsan nagyobb frekvenciával tüzeltek az ébrenlét és REM alvás alatt, mint a lassú hullámú alvás alatt. Átlagosan ezek a neuronok tüzelési frekvenciája az ébredés alatt alacsony volt, majd csökkent a csendes ébrenlét alatt és a felületes lassú hullámú alvás alatt. Ezután a neuronok tüzelési frekvenciája növekedett a kezdeti REM alvás szakaszában, majd elérték a maximális tüzelési frekvenciát a REM szakaszban.

b.) **REM alvás alatt aktív neuronok.** 75%-uk glutamaterg és 25%-uk GABAerg volt, kolinerg neuron nem volt köztük.

c.) **Ébrenlét alatt aktív neuronok.** Ezen, kizárólag glutamaterg neuronokat tartalmazó csoport az ébrenlét alatt mutatta a maximális tüzelési frekvenciát, míg REM alvás alatt a legalacsonyabbat.

Fontos megjegyezni, hogy Boucetta és mtsai. (2014) nemcsak a PPN, hanem a nucleus laterodorsalis tegmentalis és nucleus sublaterodorsalis neuronjait is belevette vizsgálatába.

3.2. Az asztrocita-neuron kommunikáció elektrofiziológiai jellemzői

A központi idegrendszer többfajta nem ingerlékeny sejtet is tartalmaz, melyeket neurogliának nevezünk. A gliasejtek közül megkülönböztetünk makro- és mikroglia. A makroglia közé tartoznak az asztrociták, oligodendrociták, Schwann-sejtek, valamint az ependyma- és radialis gliasejtek. Speciális típusú gliasejteket is találhatunk a központi idegrendszerben, a hypophysis hátsóleányében található pituiciták, a kisagy Fananas-féle tollassejtjei, a kisagykéreg asztrocita jellegű Bergmann-féle gliasejtjei, a retina Müller-féle sejtjei illetve az agykamrák körüli ependymaszervek sejtjei. A gliasejtek néhány alapvető funkcióihoz hozzátartozik a támasztó funkció, a sejt közötti tér összetételének meghatározása, az idegsejtek anyagcseréje; azonban ezektől aktívabb szerepek is jutnak nekik, melyet Cajal fedezett fel elsőként (ld. alább; Cajal, 1913; Garcia-Marin és mtsai. 2007). Az asztrocitákon belül elkülöníthetünk protoplazmás és fibrózus asztrocitákat (Kandel, 2013).

Az asztrociták számos funkcióval bírnak a központi idegrendszerben. Az asztrociták részt vesznek a szinapszisok alkotásában. A pre- és postszinaptikus neuronok mellett az asztrociták, mint harmadik résztvevők úgynevezett háromrészes („tripartite”) szinapszist alkotnak (Araque és mtsai. 1999). Különböző anyagok (pl. glutamát, adenzin, D-szerin) szabadulhatnak fel az asztrocitákból, amelyeket gliotranszmitternek nevezünk. Ők maguk is felveszik a neuronok által felszabadított neurotranszmittereket, és így képesek szabályozni a szinaptikus neurotransmissziót (Volterra és Meldolesi, 2005; Pankratov és mtsai. 2006; Tzingounis és Wadiche, 2007). Az asztrociták szinapszisokhoz közeli nyúlványain számos nagy affinitású neurotranszmitter receptort is azonosítottak. Ezek metabotróp glutamát receptorok, GABA_B receptorok, CB1 receptorok, illetve muszkarinos acetilkolin receptorok (Rusakov és Kullmann, 1998; Araque és mtsai. 2002; Panatier és mtsai. 2011).

Az asztrociták működése a neuronok homeosztázisához nélkülözhetetlen, az extracelluláris folyadékter mennyiségét és minőségét szabályozzák, fontosak a káliumion koncentráció szabályozásában, és néhány neurotranszmitter, köztük az egyik legfontosabb a glutamát felvételében és eliminálásában. Számos komplex funkciójuk is van a központi idegrendszerben, beleértve az extracelluláris környezet fenntartását az idegrendszer optimális működése érdekében, a szinaptikus plaszticitás szabályozását, valamint hozzájárulásukat különböző neuromodulációs hatásokhoz. Szerepük van továbbá az alvási homeosztázisban, neuronális hálózatok szinkronizálásában, kortikális oszcillációs aktivitásban, kemoszenzitivitásban, illetve az agyi metabolizmusban (ld. Pál, 2015). Az élettani folyamatokon felül az asztrociták számos kórkép pathogenezisében is szerephez jutnak, például neurodegeneratív megbetegedésekben, stroke-ban, epilepsziában, Alzheimer-, Huntington- és

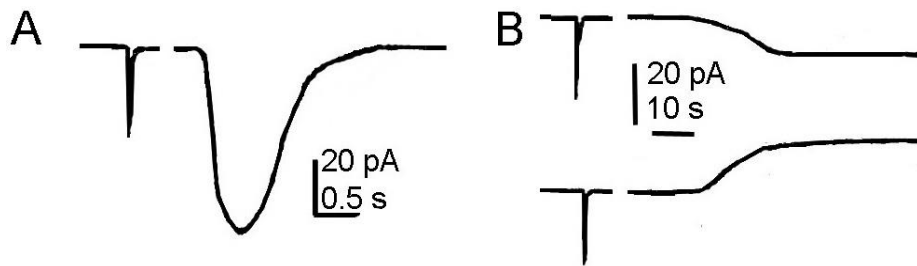
Parkinson-kórban, amyotrophiás lateralsclerosis-ban, frontotemporalis demenciában, szorongásos vagy elsődleges cerebellaris atrófiában (Tian és mtsai. 2005; Orr és mtsai. 2015; Sica, 2015; Zimmer és mtsai. 2015).

Az asztrociták nem ingerlékeny sejtek, így nem képesek akcióspotenciál-tüzelésre. Képesek azonban az intracellularis kalcium koncentrációjukat megváltoztatni és kalcium hullámokat generálni (Verkhatsky és mtsai. 2012). Ezzel összefüggésben, nem teljesen értett, összetett folyamatokon keresztül gliotranszmitter felszabadulás történik. A leginkább ismert gliotranszmitterek a következők: glutamát, adenosin trifoszfát (ATP), adenosin, gamma-amino-vajsav (GABA), D-szerin, taurin. Az asztrociták ezen kívül interleukin-1-et (IL-1), tumor nekrosis faktor alfát (TNF α), neurotrophinokat és prosztoglandinokat szabadítanak fel (Frank, 2013). A gliotranszmitterek számos módon szabadulhatnak fel, pl kalcium-függő exocytózissal (Parpura és mtsai. 1994; Bezzi és mtsai. 2004; Martineau és mtsai. 2013), csatornákon és transzportereken (pl. cisztin-glutamát transzportereken keresztül, connexon/pannexon hemicsatornákon) keresztül, ionotrop purinerg receptorokon keresztül, reverz működésű glutamát és GABA transzportereken keresztül, volumen regulált anion csatornákon vagy szerves anion transzportereken keresztül is. Az asztrociták aktivitásának következményeként a neuronon komplex jelátviteli folyamatok aktiválódhatnak és elektrofiziológiai jelenségek is előfordulhatnak. A neuronális excitabilitás az asztrocita-aktiváció hatására csökkenhet (hiperpolarizáció és tónusos kifelé irányuló áramok vagy fázisos lassú kifelé irányuló áramok generálódhatnak; ld. Pál, 2015). A neuronális excitabilitást fokozó elektrofiziológiai jelenségeket (fázisos lassú befelé irányuló áram, "slow inward current", SIC) és tónusos depolarizáció (vagy inward áram) a későbbiekben részletezzük.

3.2.1. A neuronális excitabilitást fokozó asztrocita-függő áramok

3.2.1.1. A lassú inward áramok (SIC-ek)

A lassú befelé irányuló áramok (továbbiakban SIC-ek) fázisos extraszinaptikus excitatorikus események, melyeket jellegzetes kinetikai sajátosságai miatt jól el tudunk különíteni az excitatorikus postszinaptikus áramoktól (EPSC; 4 ábra).



4. ábra. Az EPSC-k, SIC-ek és tónusos áramok sémás rajza. A. A bal oldalon a EPSC, jobb oldalon a SIC sematikus rajza látható. B. A bal oldalon szintén EPSC, a jobb oldalon tónusos inward és outward áramok figyelhetőek meg.

Az elkülönítést részben az amplitúdó, de főleg a felszálló és leszálló szárak kinetikai különbözőségei adják. A SIC-ek amplitúdója 18-477 pA közötti. A felszálló szár időtartama ("rise time") lassú (13-332 ms), és a leszálló szár egy exponenciális tartalmazó függvénnyel történő illesztésével kapott időállandója ("decay tau") 72-1630 ms. A leszálló szárát egy exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel lehet megilleszteni. Ezzel szemben az EPSC amplitúdója 19-40 pA, a "rise time" szignifikánsan rövidebb (1-6 ms) és a leszálló szárát két exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel lehet megilleszteni (Fellin és mtsai. 2004; Shigetomi és mtsai. 2008; Bardoni és mtsai. 2010; Reyes-Haro és mtsai. 2010). A SIC-ek olyan extraszinaptikus NMDA receptorok aktivációjának következményei, melyen GluN2B alegységet tartalmaznak. Általános (D-AP5), vagy GluN2B alegység specifikus NMDA receptor antagonistákkal (ifenprodil) az áram gátolható. A SIC-eket Mg^{2+} -mentes extracelluláris folyadékban lévő preparátumban könnyebben lehet kiváltani, mert az NMDA receptorok magnézium blokádjá megszűnik ebben az oldatban. A D-szerin, az NMDA receptor ko-aktivátora, szintén hozzájárul SIC-ek megjelenéséhez (Angulo és mtsai. 2004; Fellin és mtsai. 2004; Kozlov és mtsai. 2006; Reyes-Haro és mtsai. 2010). SIC-eket a központi idegrendszer számos helyén megtalálhatunk, mint a hippocampus (Angulo és mtsai. 2004; Fellin és mtsai. 2004; Perea és Araque, 2005; Carmignoto és Fellin, 2006), látókéreg (Perea és mtsai. 2014), bulbus olfactorius (Kozlov és mtsai. 2006), nucleus accumbens (D'Ascenso és

mtsai. 2007), thalamus (Parri és mtsai. 2001), nucleus medialis corporis trapezoidei (Reyes-Haro és mtsai. 2010), vagy a gerincvelő hátsó szarva (Bardoni és mtsai. 2010; Nie és mtsai. 2010).

A SIC-ek asztrociták aktivációjának következményei. Az asztrociták stimulálása a szomszédos neuronon SIC-eket vált ki, míg a gátlásuk megakadályozza a SIC-ek kialakulását. Amikor az asztrocita intracelluláris kalcium koncentrációja növekszik a preparátumban, ("calcium uncaging" kísérletben, I és II típusú glutamát receptor (mGluR) vagy muszkarinos acetilkolin receptor agonista, ATP, prosztaglandin E₂ (PGE₂), vagy az asztrociták optogenetikai aktivációja által), a SIC-ek megjelenésének valószínűsége szignifikánsan megnövekedett (Angulo és mtsai. 2004; Fellin és mtsai. 2004; Perea és Araque, 2005; D'Ascenso és mtsai. 2007; Bardoni és mtsai. 2010; Pirrtimaki és mtsai. 2011; Chen és mtsai. 2012; Perea és mtsai. 2014). Nem minden hatás növeli a kalcium koncentráció következtében kialakult SIC-ek megjelenését: a hippocampus asztrocitáin lévő P2Y₁ és PAR-1 receptorok stimulálása növeli ugyan az intracelluláris kalcium koncentrációt, de csak az utóbbi receptor aktiválása váltott ki SIC-et a piramis sejtek esetében (Shigetomi és mtsai. 2008). Az akciós potenciálok tüzelésének blokádjá, vagy szinaptikus vezikulák felszabadítása általában nincs hatással a SIC frekvenciájára, és amplitúdójára (Angulo és mtsai. 2004; Fellin és mtsai. 2004; Perea és Araque, 2005; D'Ascenso és mtsai. 2007; Pirrtimaki és mtsai. 2011). Laboratóriumunk kimutatta, hogy TTX hatására a SIC-ek frekvenciája nem változott, de amplitúdójuk szignifikánsan csökkent a PPN-ben. Ez a megfigyelés feltételezi, hogy a SIC-ek (legalább az agytörzsben) nem izolált asztrocita-aktiváció, hanem asztrocita-neuron interakciók következményei (Kovács és Pál, 2017). A központi idegrendszer különböző területein a SIC-ek kinetikája nagy variabilitást mutatott, mely annak tulajdonítható, hogy –a szinapszisokkal szemben- a gliotranszmitterek felszabadulási helye és azok receptorai messzebb és nagy variabilitást mutató távolságokra helyezkednek el egymástól. A gliotranszmitter koncentráció és azok receptorainak száma alakítja a SIC-ek kinetikáját. Az extraszinaptikus glutamát koncentráció növelésével (glutamát transzporter inhibitor TBOA segítségével) a SIC-ek amplitúdója növekedett, a "rise time" és a "decay tau" lassabbá vált. A SIC-ek jelentősége abban lehet, hogy szinkronizálják a szomszédos neuronokat egy hosszabb excitatorikus stimuláció esetében. A bemenetek hosszabb stimulálása növeli a SIC-ek frekvenciáját a nucleus accumbensben, hippocampusban, és a ventrobasis thalamusban (ld. Pál, 2015). Az asztrociták képesek SIC-ek kiváltására néhány neuronon egyideűleg a nucleus accumbensben, és a hippocampus CA1 pyramidális sejteken (Angulo és mtsai. 2004; Fellin és mtsai. 2004; D'Ascenso és mtsai. 2007; Pirrtimaki

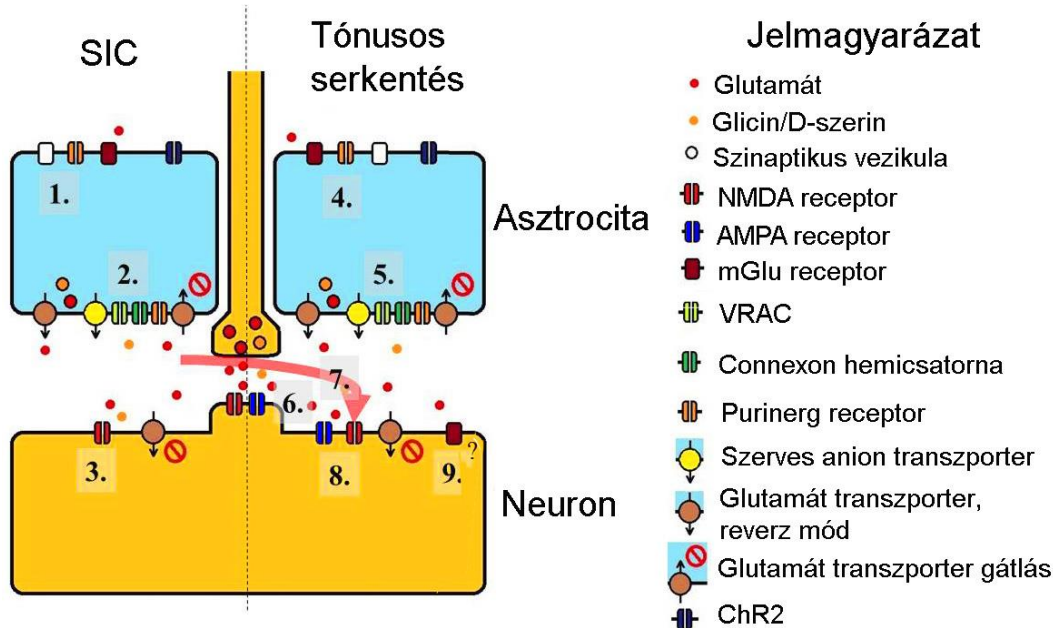
és mtsai. 2011). Ezt a szinkronizációt a rostralisabban fekvő agyterületeken lehet megfigyelni, míg az agytörzsben mért SIC-ek esetén nem (Reyes-Haro és mtsai. 2010; Kovács és Pál, 2017; 5. ábra).

3.2.1.2. Tónusos serkentő áramok

A neuronális tónusos befelé irányuló vagy serkentő áramok lassan kialakuló és az őket létrehozó hatás teljes idejére fennmaradó, nem adaptálódó áramok. Tónusos serkentő áramok szintén több agyi struktúrában előfordulnak, azonban az asztrocitákkal való kapcsolatuk kevésbé egyértelmű. Ezek az áramok túlnyomó részben az extraszinaptikus glutamát és az NMDA receptor koaktivátora, a glicin által medált folyamatok következményei (Le Meur és mtsai. 2007; Papouin és mtsai. 2012). A glicin az asztrocitákból felszabuló gliotranszmitterek egyike, amely az egyes típusú glicin transzporter reverz működése segítségével szabadul fel (Shibasaki és mtsai 2017). Ezen kívül az agytörzsi nucleus raphe magnusból származnak felszálló glicinerg rostok, melyekből szintén származhat a glicin (Bardoczi és mtsai 2017, Giber és mtsai 2015).

A glutamát eredhet a neurotranszmitter szóródásból, vagy felszabadulhat az asztrocitákból. A glutamát koncentráció emelkedése származhat még a glutamáttranszporterek reverz működéséből, vagy relatív aktivitáscsökkenéséből (Okubo és Iino, 2011; Zhou és Danbolt, 2013). Az extraszinaptikus glutamát által aktivált neuronális glutamátreceptorok heterogének. Nagyrészt extraszinaptikus NMDA receptor által közvetített mechanizmusok következtében alakul ki a tónusos excitatorikus áram (Jabaudon és mtsai. 1999; Angulo és mtsai. 2004; Fellin és mtsai. 2006; Le Meur és mtsai. 2007; Fleming és mtsai. 2011; Papouin és mtsai. 2012; Petralia, 2012; Papoulin és Oliet, 2014), azonban AMPA receptorok (Sasaki és mtsai. 2012; Beppu és mtsai. 2014) és II. csoportú metabotróp glutamátreceptorok (mGluR; Kőszeghy és mtsai. 2015) is ismertek. Tónusos excitatorikus áramok megjelenhetnek a SIC-ekkel együtt. A glutamát transzporter gátlás növeli a SIC-ek amplitúdóját az NMDA receptor függő tónusos áramok aktivációjával együtt. Valószínű, hogy az asztrocitából származó glutamát a hozzá legközelebb eső neuronon vált ki SIC-et, valamint számos távolabbi NMDA receptort aktivál kisebb koncentrációval, így a távolabbi neuronokon tónusos befelé irányuló áramot váltanak ki (Jabaduon és mtsai. 1999; Angulo és mtsai. 2004). Tónusos excitatorikus áramokat regisztráltak a hippocampusban (Jabaudon és mtsai. 1999; Angulo és mtsai. 2004; Fellin és mtsai. 2006; Le Meur és mtsai. 2007; Papouin és mtsai. 2012), a nucleus supraopticusban (Fleming és mtsai. 2011), a gerincvelő dorsalis szarvában (Nie és mtsai. 2010), a PPN-ben

(Kőszeghy és mtsai.2015), és a cerebellum Purkinje-sejtjein (Sasaki és mtsai. 2012). A tónusos befelé irányuló áramok létrejöttéhez az asztrociták hozzájárulásának direkt és indirekt bizonyítékai is vannak. Az asztrocita funkciók gátlása gliotoxinokkal, az EAAT1 és -2 glutamát transzporterek és az asztrocita glutamin szintetáz blokádjá a tónusos befelé irányuló áramok amplitúdójának növekedését okozzák (Jabaudon és mtsai. 1999; Angulo és mtsai. 2004; Le Meur és mtsai. 2007; Fleming és mtsai. 2011). Az asztrociták P2X₇ receptorainak stimulálása, vagy gliotranszmitter felszabadulás hasonló hatást vált ki (Fellin és mtsai. 2004). Direkt bizonyítékként a Bergmann glia optogentikai aktivációja tónusos inward áramokat hoz létre (Sasaki és mtsai. 2012; Beppu és mtsai. 2014). Az asztrociták optogenetikai stimulációja tónusos depolarizációt vált ki, és növeli a tüzelési frekvenciát a nucleus retrotrapezoidus (Figueiredo és mtsai. 2011) és a látókéreg területein (Perea és mtsai. 2014; 5. ábra).

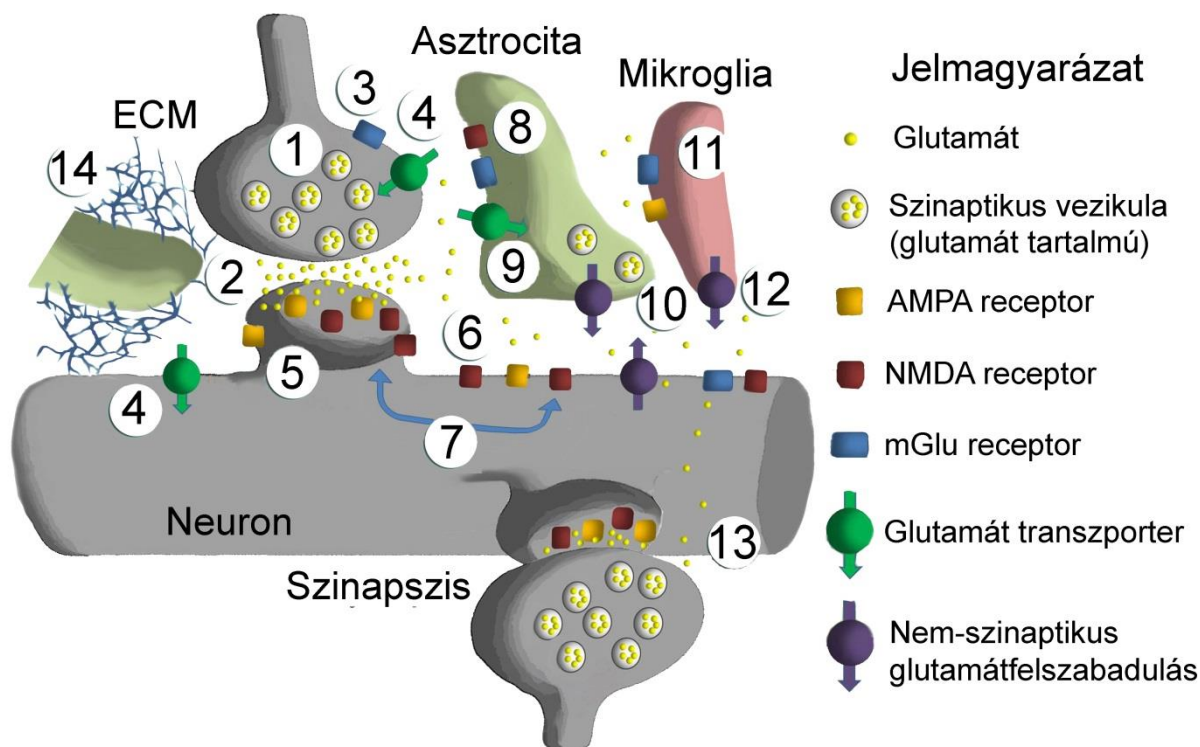


5. ábra. Asztrocita-függő neuronális serkentő áramok kialakulása. SIC-ek: 1. Asztrocita aktiváció. **2.** Glutamát (D-szerin, glicin) felszabadulás az asztrocitákból. **3.** Extraszinaptikus NMDA receptor aktiváció. Tónusos serkentés: **4.** Asztrocita-aktiváció. **5.** Glutamát (D-szerin, glicin) felszabadulás az asztrocitákból. **6.** Szinaptikus glutamát szóródás. **7.** A közelebbi NMDA receptorokon nagyobb koncentrációjú glutamát SIC-eket, míg az alacsonyabb koncentrációjú glutamát a távolabbi NMDA receptorokon tónusos inward áramot vált ki. **8.** Extraszinaptikus NMDA-, AMPA- és **(9)** metabotróp glutamátreceptor-aktiváció (Pál, 2015 alapján). VRAC: volumenregulált anioncsatorna, ChR2: channelrhodopsin-2.

3.2.2. Az extraszinaptikus glutamát és hozzájárulása az alvás-ébrenlét szabályozáshoz

A glutamát nemcsak a szinaptikus részben, hanem extraszinaptikusan is megtalálható. Míg a szinaptikus vezikulák felszabadulásakor a szinaptikus részben akár 6 mmol/l is lehet a koncentrációja, addig az extraszinaptikus részben annál jóval alacsonyabb, mikro- nanomólos tartományú (0,18 – 33 $\mu\text{mol/l}$). Az extraszinaptikus glutamát fő forrásai a szinaptikus részből történő szóródás és az asztrocitákból és mikroglíából történő felszabadulás. Receptorai az extraszinaptikus NMDA, AMPA és metabotróp glutamátreceptorok, amelyek nemcsak a neuronokon, de a gliasejteken is megtalálhatóak. Az extraszinaptikus glutamát a szinaptikus plaszticitásban és a neuronok ingerlékenységében játszik szerepet, így járul hozzá számos fiziológiai és pathofiziológiai folyamathoz. Ezen fiziológiai folyamatok egyike az alvás-ébrenlét szabályozása (ld. Pál, 2018; 6. ábra).

Az agykéreg, thalamus, anterior hypothalamus és az agytörzs területén az alvás-ébrenlét különböző szakaszaiban glutamát szabadul fel (Mark és mtsai. 1969; Bettendorf és mtsai. 1996; Kodama és Honda, 1999). Éber állapotban és REM alvás alatt növekszik a koncentrációja, míg NREM alatt csökken (Dash és mtsai. 2009). Az alvásmegvonás kezdetben növeli a kérgi glutamát szintet, majd a plató elérése után csökkenni kezd annak ellenére, hogy az alvásmegvonás még tart. A RAS-ban a neuronális excitabilitás szabályozása extraszinaptikus glutamát szint szabályozásával megy végbe, különféle mGluR és NMDA receptorok közreműködésével (Kovács és Pál, 2017; Kovács és mtsai. 2017; Kőszeghy és mtsai. 2015). A lateralis hypothalamusban az alvásmegvonás válaszként az asztrociták megváltoztatják az 1-es típusú glutamáttranszporter (GLT1) kihelyeződését az orexin és MCH neuronok közelében. A kortikális oszcillációs aktivitás szintén az extraszinaptikus glutamát szint szabályozása alatt áll. A kortikális glutamát szint változásai aktivitásfüggőek: a glutamaterg bemenetek nagymértékű aktivációja a szinaptikus glutamát szóródásához vezet, ami –az asztrocitákból felszabaduló glutamáttal együtt- extraszinaptikus NMDA receptorokon keresztüli depolarizációhoz és a corticalis aktivitás aktív fázisának kialakulásához vezet. Az asztrociták kortikális aktivációban betöltött szerepét jelzi, hogy az asztrociták optogenetikai aktivációja glutamátfelszabaduláson keresztül képes a neuronhálózatok szinkronizált aktivációjának kialakítására (Poskanzer és Yuste, 2016). Mindezekon túl a posterior hypothalamus asztrocitáinak szelektív optogenetikai stimulációja mind a REM, mind a nem-REM alvás idejét megnyújtotta (Pelluru és mtsai. 2016).



6. ábra. Az extraszinaptikus glutamát eredete, diffúziója és szabályozása. 1. Glutamátfelszabadulás szinaptikus vezikulákból. 2. 6-7 mmol/l glutamát a szinaptikus részben, szinaptikus NMDA- és AMPA-receptor felszabadulás. 3. Szinaptikus glutamátfelszabadulás mGluR-függő szabályozása. 4. Neuronális glutamátfelvétel glutamáttranszporterekkel. 5. Periszinaptikus NMDA- és AMPA-receptorok. 6. Extraszinaptikus NMDA-, AMPA- és metabotróp glutamát receptorok. 7. A szinaptikus és extraszinaptikus receptorkészletek közti közlekedés. 8. Az asztrociták NMDA- és AMPA-receptorai. 9. Asztrocita glutamátfelvétel glutamáttranszporterekkel. 10. Glutamátfelszabadulás az asztrocitákból (vezikuláris és nem-vezikuláris mechanizmusokkal). 11. Mikroglialis AMPA- és metabotróp glutamát receptorok. 12. Mikroglialis glutamátfelszabadulás. 13. Heteroszinaptikus aktiváció glutamát szóródás által. 14. Az extracelluláris mátrix (ECM) és az asztrocita nyúlványok limitálják és lassítják a glutamát diffúzióját (Pál, 2018 alapján).

3.2.3. A PPN SIC-einek sajátosságai és a rajtuk érvényesülő neuromodulációs hatások

A PPN neuronjain nemcsak EPSC-eket, de SIC-eket is lehet mérni (Kovács és Pál, 2017). A PPN-ben található SIC-ek tulajdonságai alapvetően nem különböznek a más agyterületek neuronjain létrejövő SIC-ektől, azonban néhány különbséget (l. alább) talált laboratóriumunk.

A SIC-eket jól el lehet különíteni az EPSC-től, kinetikájuk alapján. A SIC-ek lassabb kinetikával rendelkeznek, mint a spontán vagy miniatűr excitatorikus posztzinaptikus áramok

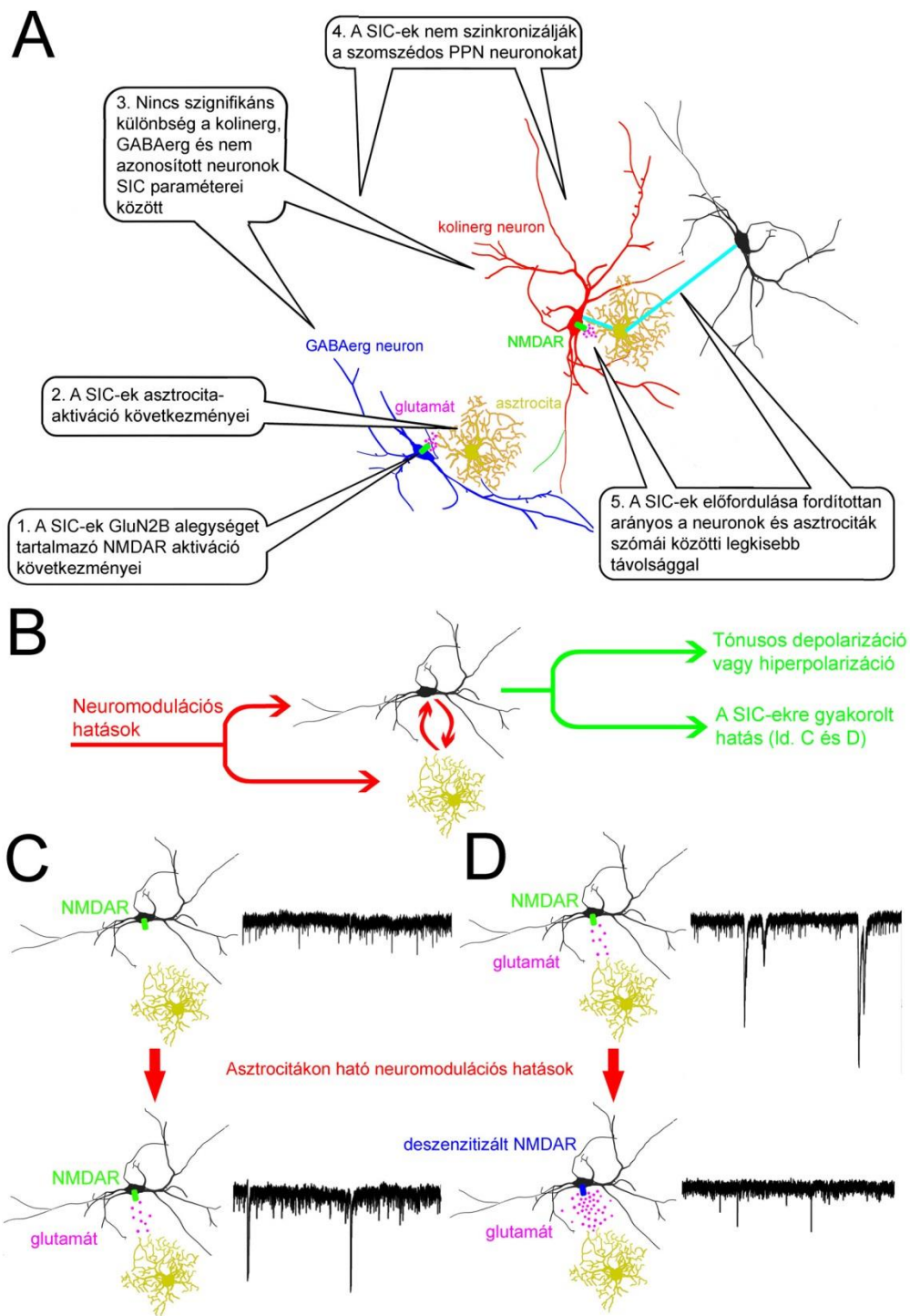
(sEPSC-k, mEPSC-k). A SIC-ek amplitúdója általában nagyobb, azonban ez esetleg átfedésben lehet az EPSC amplitúdótartományával. A "rise time" és a "decay tau" jobb támpontok lehetnek a két esemény elkülönítéséhez, hiszen az EPSC-k és a SIC-ek mért adatainak értéktartományai átfedést nem mutatnak (Fellin és mtsai. 2004; Pál, 2015; Kovács és Pál, 2017). Általánosságban elmondhatjuk, hogy a PPN-ben lévő SIC-ek szintén asztrociták aktivációjának következményei, mely során az asztrocitákból glutamát szabadul fel. Olyan extraszinaptikus NMDA receptor aktiválódik, mely GluN2B alegységet tartalmaz. Az asztrociták optogenetikai aktivációja a SIC-ek frekvenciáját, amplitúdóját, az általuk megvalósuló töltésmozgást megnöveli.

Ellentétben más struktúrákon lévő SIC-ektől, azok nem jelennek meg egyszerre a szomszédos neuronokon, tehát nem szinkronizálják a szomszédos neuronokat. Hasonlóan a PPN neuronjaihoz, az agytörzs hallópálya egy magjában sem mutatták ki a SIC-ek szinkronizációját (Reyes-Haro és mtsai. 2010). A SIC-ek előfordulása egyes neuronokon függ attól, hogy neuron szómája és a legközelebbi asztrocita szómája között mekkora a távolság. Minél közelebb van az asztrocita szómája a neuron szómájához, annál több SIC jelenik meg a neuronon. Ennek feltehetően az az oka, hogy az asztrocita végtalpak kritikusan nagy száma van ilyenkor a neuron szómájával kapcsolatban. A sejtek neurokémiai alcsoportjai azonban nincsenek összefüggésben a SIC-ek megjelenésével, tehát kolinerg és nem kolinerg (GABAerg és glutamaterg) neuronokon is hasonló arányban fordul elő (Kovács és Pál 2017).

A SIC ek szerepet játszanak a neuromodulációs hatásokban (Kovács és Pál 2017). A CB1 receptor agonista WIN55,212-2 alkalmazása esetén, a neuronokon tónusos kifelé és befelé irányuló áramok alakultak ki. A kontrollhoz képest a változás abszolút értékének átlaga szignifikánsan meghaladta a spontán alapáram fluktuációt. A SIC-ek általi töltésmozgás változása lineáris összefüggést mutatott a kontrollban mért SIC-ek általi töltésmozgástól. Amennyiben a kontroll SIC töltésmozgás kisebb volt, mint 3 pC/min, úgy a CB1 receptor agonista adását követően nőtt a SIC-ek általi töltésmozgás, míg ha a SIC-ek területe nagyobb volt kontroll esetben, mint 3 pC/min, akkor az agonista adása gátolta a SIC-ek megjelenését. A muszkarinos agonista karbakol, valamint szerotonin alkalmazása mellett szintén kialakultak tónusos kifelé és befelé irányuló áramok, valamint a SIC-ek területében bekövetkező változások hasonlóak voltak, mint a CB1 agonista adását követő megfigyeléseknél. (Kovács és Pál, 2017). A különböző neuromodulációs hatások a SIC-ek re gyakorolt hatása függ az eredeti SIC aktivitástól. A SIC aktivitás modulációja néhány kivételtől eltekintve az endokannabinoid,

kolinerg és szerotoninergerg neuromodulációs hatások esetén nagyrészt független a tónusos áramok keletkezésétől.

A SIC-eken megfigyelt neuromodulációs hatások valószínű háttere az NMDA receptor deszenzitizációja. A glutamátfelvétel gátlása esetén hasonló jelenséget lehetett megfigyelni, mint a neuromodulációs hatásoknál. Ha a SIC kontroll körülmények közötti töltésmozgása kisebb volt, mint $3\text{pC}/\text{min}$, ott a töltésmozgás növekedett. Ahol a SIC töltésmozgása a kontroll körülmények között nagyobb volt, mint $3\text{pC}/\text{min}$, ott a glutamátfelvétel gátlása csökkentette a töltésmozgást. A PPN NMDA receptor mediált áramain, ismételt glutamátfelszabadítás hatására deszenzitizáció volt megfigyelhető. Mindezek alapján valószínű, hogy ha az extraszinaptikus glutamát koncentráció alacsony és a neuromodulációs hatások asztrocitákból glutamátot szabadítanak fel, ez a glutamát fokozza a SIC aktivitást. Ha az extraszinaptikus glutamát koncentráció és a SIC aktivitás eleve magas, az asztrocitákból felszabaduló többlet glutamát már NMDA receptor deszenzitizációt és a SIC aktivitás csökkenését okozza (Kovács és Pál, 2017; 7. ábra).



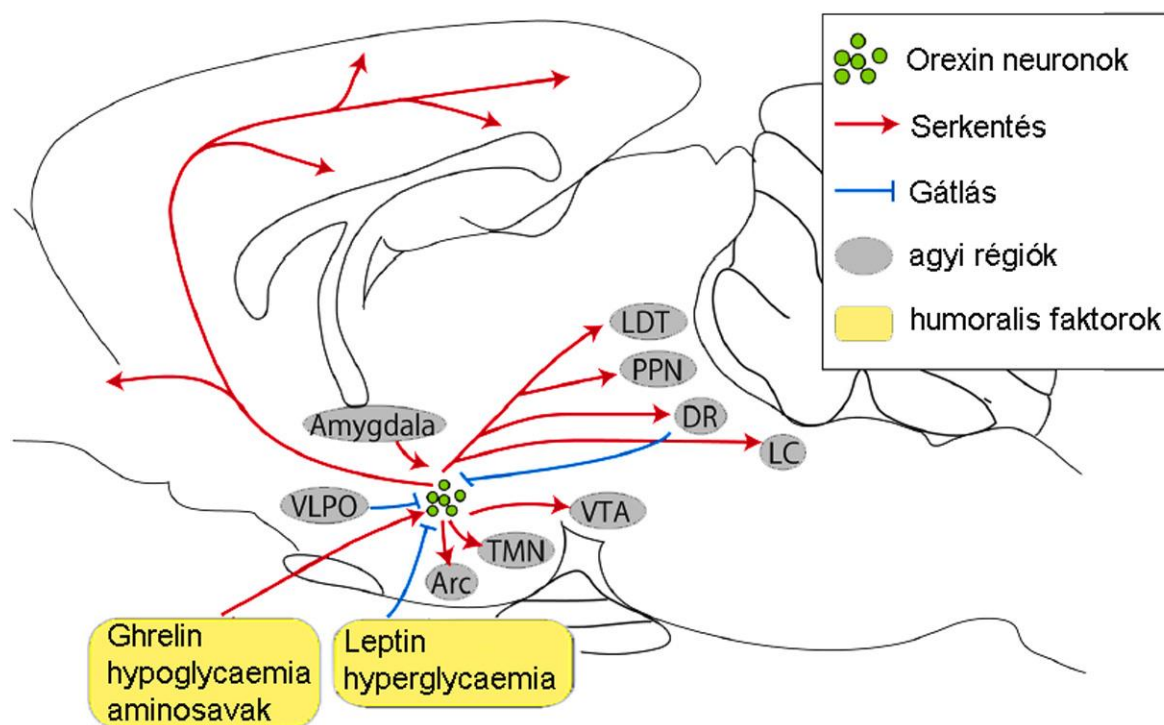
7. ábra.
A PPN

neuronjain létrejövő SIC-ek sajátosságai. **A.** A SIC-ek általános jellemzői. **B.** A PPN-en érvényesülő egyes neuromodulációs hatások direkt neuronális támadáspontúak, míg mások az asztrocita-neuron kommunikációra hatnak (piros nyilak). Mindezen hatások tónusos depolarizációhoz vagy hiperpolarizációhoz vezetnek, valamint ettől függetlenül a SIC-ekre fejtenek ki hatást. **C és D.** A SIC-ekre kifejtett neuromodulációs hatások. Ha az extraszínaptikus glutamát koncentrációja alacsony, a glutamátfelszabadulást előidéző neuromodulációs hatások a SIC-ek létrejöttét stimulálják (C), míg magas kiindulási extraszínaptikus glutamát koncentráció esetén az NMDA receptorok deszenzitizációján keresztül gátolják (D).

3.3. Az orexinerg neuromoduláció

Az orexin, vagy hypocretin a lateralis hypothalamusban található orexinerg neuronokból felszabaduló, először 1998-ban azonosított peptid, melyet számos fiziológiai funkcióval hozhatunk összefüggésbe. Ilyenek az alvás-ébrenlét szabályozása, homeosztatikus, endokrin, visceralis funkciók. Patofiziológiai folyamatokhoz is kapcsolódik, mint narcolepsia vagy kábítószerfüggőség. Két típusa, az orexin A és orexin B egy közös polipeptidből, a prepro-orexinből származnak, és eredetileg a táplálkozással összefüggő hormonnaként azonosították. Az orexinerg neuronok az agykéregbe, thalamusba, bulbus olfactoriusba, basalis előagyba, nucleus arcuatusba, nucleus tuberomammillarisba, az area tementalis ventralisba, a nucleus laterodorsalis tementalisba, a raphe magvakba, a nucleus pedunculopontinusba és a locus coeruleusba projiciálnak. Gátló bemenetet kapnak a nucleus raphe dorsalis felől, míg az amygdala felől serkentő bemenet szabályozza működésüket. A humorális faktorok közül a ghrelin, aminosavak és a hypoglycaemia serkenti, míg a leptin és a hyperglycaemia gátolja őket (ld. Tsujino és Sakurai, 2009; Inutsuka és Yamanaka, 2013; 8. ábra).

Az orexinek két, G_q protein kapcsolt receptoron keresztül fejtik ki hatásukat, ezek az 1-es (OXR1) és 2-es típusú orexin (OXR2) receptorok. Míg az OXR1 nagyobb affinitással köti az orexin A-t, addig az OXR2 mindkét típusú orexint azonos affinitással köti meg. Az OXR1 megtalálható például a cortexben, hippocampusban, paraventricularis thalamusban, ventromedialis hypothalamusban, nucleus arcuatusban, nucleus raphe dorsalisban, locus coeruleusban, substantia nigrában, és az area tementalis ventralisban. OXR2 a agykéregben, nucleus septalisban, hippocampusban, a thalamus medialis magcsoportjaiban, a nucleus raphe dorsalisban és medianusban, a nucleus tuberomammillarisban, dorsomedialis és paraventrikuláris hypothalamus magokban, a substantia nigrában és a az area tementalis ventralisban fordul elő (Backberg és mtsai. 2002; Bourgin és mtsai. 2000; Cluderay mtsai. 2002; Greco és Shiromani, 2001; Hervieu mtsai. 2001; Marcus mtsai. 2001; Suzuki mtsai. 2002; Trivedi mtsai. 1998).



8. ábra. Az orexinerg neuronok kapcsolatai. VLPO: nucleus preopticus ventrolateralis; Arc: nucleus arcuatus; TMN: nucleus tuberomammillaris; VTA: area tegmentalis ventralis; LDT: nucleus laterodorsalis tegmentalis; PPN: nucleus pedunculo pontinus; DR: nucleus raphe dorsalis; LC: locus coeruleus (Inutsuka és Yamanaka, 2013 alapján)

3.3.1. Az orexin élettani és kórélettani szerepei

3.3.1.1. Alvás-ébrenlét szabályozás

Nem sokkal az orexin felfedezése után egyértelmű kapcsolatot mutattak ki az orexin deficiencia és a narkolepszia nevű alvási rendellenesség között. A narkolepszia egy nappali álmosággal és az ébrenlét stabilitásának elvesztésével, az alvás elején jelentkező REM alvási periódussal, valamint kataplexiával (tudatvesztés nélküli bilaterális izomtónusvesztéssel) járó állapot. A prepro-orexin gén elvesztése egerekben a humán narkolepsiára nagyban emlékeztető állapotot hoz létre (Chemelli és mtsai. 1999). Az OX2R elvesztése esetén kutyákban ugyancsak narkolepszia jön létre (Lin és mtsai. 1999). Ugyanezen receptor hiánya egérben szintén narkolepsiához vezetett, de a tünetek enyhébbek voltak, mint a prepro-orexin knockout állatban (Willie és mtsai. 2003). Az OX1R elvesztése ezzel szemben nem járt narkolepszia-szerű tünetekkel (Sakurai, 2007; Hondo és mtsai. 2010; Mieda és mtsai. 2011). Humán narkolepszia esetén az orexinerg neuronok 80-100%-os elvesztését és az orexin-A szint

nagymértékű csökkenését lehetett megfigyelni (Peyron és mtsai. 2000; Mignot és mtsai. 2002; Tsujino és Sakurai, 2009).

A hypothalamus orexinerg neuronjai a tüzelési frekvencia növekedését váltják ki az ébrenlélet elősegítő, a retikuláris aktivációs rendszerhez tartozó magvak neuronjain. Ilyenek a locus coeruleus noradrenerg (Hagan és mtsai. 1999), a nucleus raphe dorsalis szerotoninerg (Brown és mtsai. 2002), a nucleus tuberomammillaris hisztaminerg (Yamanaka és mtsai. 2002) és a bazális előagy, nucleus pedunculopontinus és nucleus laterodorsalis tegmentalis kolinerg neuronjai (Eggermann és mtsai. 2001; Burette és mtsai. 2002). Orexin-A injekciója a nucleus laterodorsalis tegmentalisba az ébrenléletben töltött időt növeli és a REM alvás idejét csökkenti (Xi és mtsai. 2001). A PPN-be adott orexin-A az izom atónia kialakulását gátolta (Takakusaki és mtsai. 2005). Az orexinerg neuronok *in vivo* szelektív optogenetikai aktivációja a nem-REM és REM alvásból ébrenléletbe történő átmenet valószínűségét megnyújtja (Adamantidis és mtsai. 2007). Az orexinerg neuronok kemogenetikai aktivációja megnövelte az ébrenléletben töltött időt, míg csökkentette mind a REM-, mind a nem-REM alvás idejét (Sasaki és mtsai. 2011; 9. ábra).

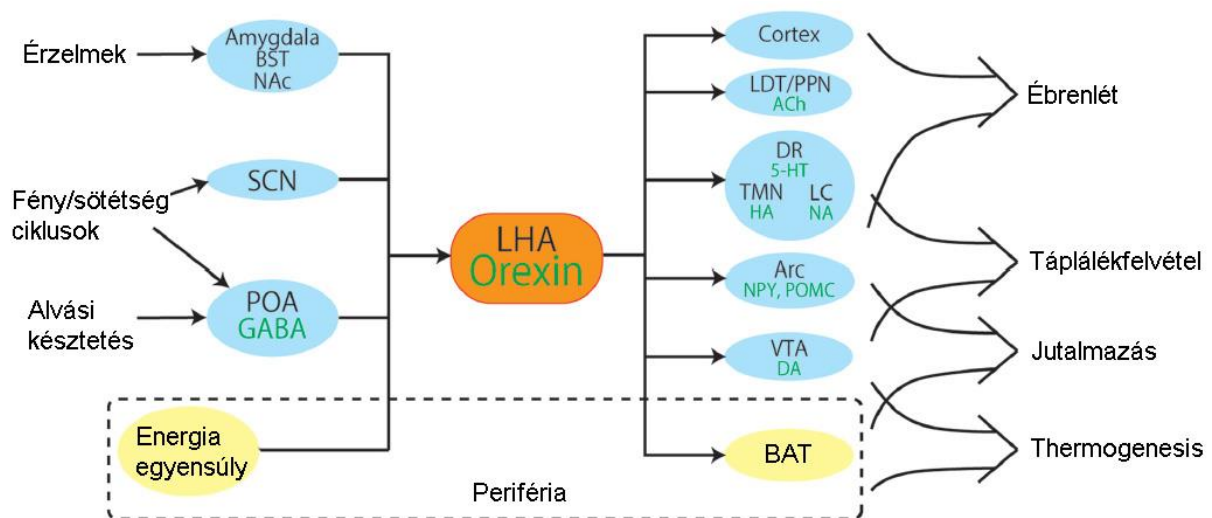
3.3.1.2. Homeosztázis és táplálékfelvétel

A lateralis hypothalamus más hypothalamikus agyterületekkel együtt (nucleus arcuatus, dorsomedialis hypothalamus, nucleus paraventricularis) fontos szerepet játszik a táplálékfelvétel és energia homeosztázis szabályozásában. A nucleus arcuatus proopiomelanocortint (POMC) és neuropeptid Y-t (NPY) kifejező neuronjai az orexinerg neuronoknak bemenetet adnak (Elias és mtsai. 1998), valamint a nucleus arcuatus fogad is orexinerg bemenetet (Yamanaka és mtsai. 2000). A perifériás szabályozó faktorok közül a ghrelin, a hypoglycaemia és az aminosavak serkentették, míg a leptin és a hyperglycaemia gátolták az orexinerg neuronok aktivitását (Inutsuka és Yamanaka, 2013). Ugyancsak az orexinerg rendszer energia homeosztázisban betöltött szerepét jelzi, hogy a narkolepsiában szenvedő betegek esetén csökkent kalóriabevitelt és megnőtt testtömeg indexet figyeltek meg (Schuld és mtsai. 2000). Ehhez hasonlóan, az orexin receptor knockout egereken hypophagiát és késői kezdetű obesitást lehetett megfigyelni (Hara és mtsai. 2001; 9. ábra).

Az ébrenlélet és az energia homeosztázis orexin általi szabályozása valószínűleg úgy függ össze, hogy az éhes állatban termelődő orexin hosszú ébrenléti periódusokat alakít ki, ami lehetővé teszi az állatnak a táplálékkeresést (Tsujino és Sakurai, 2009).

3.3.1.3. Jutalmazás, motiváció

Az orexinerg neuronok a jutalmazási rendszer több területére (mint pl. a locus coeruleus, area tegmentalis ventralis és a nucleus accumbens) is projiciálnak (Fadel és Deutsch, 2002). Az orexin az area tegmentalis ventralis dopaminerg neuronjait közvetlenül aktiválja, és potenciózza azok NMDA receptor függő szinaptikus neurotranszmisszióját (Korotkova és mtsai. 2003; Borgland és mtsai. 2006). Az agykamrákba vagy közvetlenül az area tegmentalis ventralisba injektált orexin serkenti a kísérleti állat jutalommotivált viselkedését (Harris és mtsai. 2005; 9. ábra).



9. ábra. Az orexin élettani funkciói (Inutsuka és Yamanaka, 2013 alapján). 5-HT: szerotonin, ACh: acetilkolin, Arc: nucleus arcuatus, BAT: barna zsírszövet, BST: bed nucleus, stria terminalis, DA:dopamin, DR: nucleus raphe dorsalis, GABA: gamma-amino vajsav, HA: hisztamin, LC: locus coeruleus, LDT: nucleus laterodorsalis tegmentalis, LHA: lateralis hypothalamicus area, NA: noradrenalin, NAc: nucleus accumbens, NPY: neuropeptid Y, POA: area preoptica, POMC: proopiomelanocortin, PPN: nucleus pedunculo pontinus, SCN: nucleus supra chiasmaticus, TMN: nucleus tuberomammillaris, VTA: area tegmentalis ventralis.

4. CÉLKITŰZÉSEK

Disszertációm egyik célja a régi, immunhisztokémiai azonosításokra épülő *in vitro* elektrofiziológiai csoportosítások újraz vizsgálása transzgen technikák segítségével azonosított PPN kolinerg neuronokon, valamint esetleges újabb csoportosítási lehetőségek felismerése.

1. Igazolni kívántuk azt, hogy kísérleteinkben a tdTomato valóban kolinerg neuronokban fejeződik ki, és nem csak a fejlődés során egy átmeneti ChAT expresszió következménye.
2. A PPN-en belül a korábbi kategóriák szerinti funkcionális alcsoportok meglétét terveztük vizsgálni genetikailag kódolt markert kifejező egereken, esetleg a kolinerg neuronok új funkcionális csoportosításának lehetőségeit vizsgáltuk meg.
3. Fel kívántuk térképezni, hogy a különböző funkcionális tulajdonságok mutatnak-e rostrocaudalis eloszlásbeli különbségeket.
4. Meg kívántuk tudni, hogy a funkcionális és morfológiai sajátosságok korrelálnak-e egymással.

A jelen munka további célja volt a PPN neuronjaira ható egyik lényeges neuromodulációs hatás, az orexinerg neuromoduláció vizsgálata.

5. Az orexinnek a SIC-ekre kifejtett hatását kívántuk megfigyelni.
6. Az egységes, asztrocitafüggő neuromodulációs hatás esetleges létének a lehetőségét is terveztük vizsgálni.

5. ESZKÖZÖK ÉS MÓDSZEREK

5.1. Oldatok, vegyszerek

A kísérleteinkhez mesterséges agy-gerincvelői folyadékot („arteficial cerebrospinal fluid”; aCSF) használtunk, melyet a következő összetételben készítettünk:

- 120 mmol/l NaCl;
- 2,5 mmol/l KCl;
- 26 mmol/l NaHCO₃;
- 10 mmol/l glükóz;
- 1,25 mmol/l NaH₂PO₄;
- 3 mmol/l myo-inositol;
- 0,5 mmol/l aszkorbinsav;
- 2 mmol/l nátrium piruvát
- 1 mmol/l CaCl₂;
- 1 mmol/l MgCl₂;

Az oldat pH-ja 7,4 volt.

Az agyszeletek preparálását jéghideg alacsony nátriumtartalmú mesterséges agy-gerincvelői folyadékban végeztük ("low Na aCSF"). Az oldatban 95 mmol/l NaCl-t 60 mmol/l glicerollal és 130 mmol/l szacharózzal helyettesítettünk.

A vegyszerek beszerzése a Sigma-tól történt (St. Louis, MO, USA), kivéve azoknál az oldatoknál, ahol ezt külön említjük.

Az egyes mérésekhez a következő vegyszereket használtuk még:

- tetrodotoxin (TTX)-citrát 1 μmol/l (Alomone Laboratories, Jerusalem, Istraél). Az akcióspotenciál-tüzelés gátlására használtuk.
- CdCl₂ 50 μmol/l. A kalciumáramok általános gátlószereként alkalmaztuk.
- orexin-A 200 nmol/l (Tocris Cookson Ltd. Bristol, UK). Az orexinerg hatások kiváltására alkalmaztuk.
- 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-szulfamoil-benzo[f]quinoxalin (NBQX) 10 μmol/l; D-(-)-2-amino-5-foszfonopentanoát (D-AP5; Tocris Cookson Ltd. Bristol, UK) 50 μmol/l;

bikukullin 10 $\mu\text{mol/l}$; sztrichnin 1 $\mu\text{mol/l}$. A gyors szinaptikus neurotranszmissziót blokkoló koktélként alkalmaztuk előkísérletekben.

5.2. Állatok, preparálás

Az állatkísérletek elvégzése a magyar és nemzetközi törvények és intézményi irányelvek és protokollok (2010/63/EU sz. direktíva) által meghatározott módon történt.

A kísérleti protokollokat, melyeket használtunk a Debreceni Egyetem Állatjóléti Bizottsága vette nyilvántartásba (5/2015/DEMÁB; 8/2015/DEMÁB) és a Hajdú-Bihar Megyei Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága engedélyezte.

Kísérleteinkhez 9-22 napos egereket használtunk fel. Azon egerek közül, amelyek tdTomato fluoreszcens proteint fejeztek ki kolin acetiltransferáz-függő módon (ChAT-tdTomato), összesen 59 egyedet használtunk vegyesen. A tdTomato-t 2-es típusú vezikuláris glutamáttranszporter- (Vglut2-) függően kifejező egerekből (Vglut2-tdTomato) 25 példányt használtunk fel. A tdTomato-t gliális fibrilláris savas protein-függő módon kifejező egerekből (GFAP-tdTomato) 8 példányt használtunk fel. Hímeket és nőtényeket vegyesen alkalmaztunk. Az egértörzseket a Jackson Laboratories-től szereztük be (Bar Harbor, ME, USA), melyek homozigóta lox-tdTomato (B6;129S6-Gt(ROSA)26Sor^{tm9(CAG-td Tomato)Hze/J}, Jax szám: 007905) és a ChAT-cre (B6;129S6-Chat^{tm2(cre)Low1/J}; Jax szám: 006410), Vglut2-cre (Slc17a6tm2(cre)Low1 (vagy Vglut2-ires-Cre); Jax szám: 028863), valamint GFAP-cre (B6.Cg-Tg(Gfap-cre)73.12Mvs/J; Jax szám: 012886) egerek voltak. Keresztezésüket az Élettani Intézet állatházában végeztük.

A keresztezés során a cre-lox rendszert használtuk, ahol az egyik szülő promoter-specifikusan fejezi ki a cre rekombinázt, a másik szülő genomjában megtalálható a kifejezteni kívánt fehérje génje, de annak átíródását egy lox-P site-okkal határolt stop kodon akadályozta meg. Az utódokat keresztezve, a stop kodon kihalása megtörténik és a kifejezteni kívánt fehérje promoter specifikusan jelenik meg. A homozigóta törzsek keresztezéséből származó utódok mindkét génre heterozigóták voltak, így a tdTomato fluoreszcens protein átíródhatott ChAT- vagy GFAP-függő módon.

Az egereket dekapitáltuk, a koponyatetőt körbevágtuk, majd az agyat óvatosan eltávolítottuk. A lehető legrövidebb idő alatt kipreparáltuk a középagyi területet, majd 200 mikrométeres coronalis szeleteket készítettünk, alacsony nátrium tartalmú jéghideg (körülbelül 0- -2° C) mesterséges agy-gerincvelői folyadékban Microm HM 650V típusú vibratóm (Microm International GmbH, Walldorf, Németország) segítségével, miközben folyamatosan oxigenizáltattuk 95% O₂ és 5% CO₂ keverékével (karbogén gázkeverék).

A szeleteket 37°C-on, normál aCSF-ben tartottuk 60 percen át a mérés kezdetéig, mindeközben folyamatosan karbogén gázkeverékkel buborékolattuk a szeleteket tartalmazó kamrát.

5.3. Elektrofiziológiai mérések

Teljes sejtes elrendezésű patch clamp méréseket alkalmaztunk feszültség clamp és áram clamp üzemmódban, melyhez Axopatch 200A (Molecular Devices, Union City, CA, USA) erősítőt használunk. A szeletek láthatóvá tételéhez Zeiss Axioskop mikroszkópot (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Németország) használtunk, melyhez egy fluoreszcens képalkotórendszert kapcsolunk (Till Photonics GmbH, Grafeling, Németország). A fluoreszcens képalkotó rendszer része egy xenon izzó alapú Polychrome V-ös fényforrás (Till Photonics GmbH, Grafeling, Németország), egy CCD kamera (SensiCam, PCO AG, Kelheim, Németország), valamint tartalmaz egy képalkotó-szabályozó egységet („imaging control unit”; ICU), és a Till Vision szoftvert (4.0.1.3. verzió). Ez a rendszer lehetővé teszi a fluoreszcencia intenzitás változásának megfigyelését. Az adatok rögzítéséhez és feldolgozásához Clampex 10 szoftvert használtunk (Molecular Devices, Union City, CA, USA), míg elemzésükhöz Clampfit 10 (Molecular Devices, Union City, CA, USA) programot.

A méréseket minden esetben szobahőmérsékleten (24-26 C fok) végeztük és a szeleteket a mérés során folyamatosan oxigenizált normál aCSF-fel perfundáltattuk 1 ml/perc sebességgel, Gilson Minipuls 3 perisztaltikus pumpa segítségével (Gilson Inc. Middleton, WI, USA).

Az 6-8 M Ω rezisztenciájú patch pipettákat boroszilikát üvegapillárisokból készítettük Narishige PC-10 pipettahúzó segítségével (Narishige Group, Tokyo, Japán), A belső pipettát kálium-glükonát alapú belső oldattal töltöttük meg. A mérések során használt mikropipetta oldat (belső oldat) a következő összetevőkből állt:

- 120 mmol/l kálium-glükonát;
- 5 mmol/l NaCl;

- 10 mmol/l 4-(2-hidroxietyl)-1-piperzeinetán-szulfonsav (HEPES);
- 10 mmol/l Na₂-foszfokreatinin;
- 2 mmol/l EGTA;
- 0,1 mmol/l CaCl₂;
- 5 mmol/l Mg-ATP;
- 0,3 mmol/l Na₃-GTP;
- 8 mmol/l biocitin,

Az oldat pH-ja 7,3 volt, és a biocitin oldatba helyezése közvetlenül a mérések előtt történt.

A mérések során csak a stabil felvételeket vettük figyelembe, illetve azokat, ahol az ellenállás a sorozatméréseknél végig 30 MΩ alatti volt kevesebb, mint 10%-os változással. Mint azt korábban említettem áram clamp és feszültség clamp üzemmódot is alkalmaztunk a mérések során.

Az alább részletezett mérési protokollokat a 10. ábrán is be kívánom mutatni.

A. Áram clamp üzemmódban 1 s hosszúságú négyszög impulzust alkalmaztunk -30 pA és +120 pA áraminjekciókat alkalmazva 10 pA-es lépcsőkkel. A nyugalmi membrán potenciál -60 és -80 mV volt attól függően, hogy milyen kísérletet végeztünk. A következő méréseket végeztük ebben az üzemmódban.

1. A bemenő ellenállás: az általunk elektromosan kontrollált membrán ellenállása. Úgy számoltuk, hogy vettük a protokoll kezdete előtti 10 ms hosszúságú periódus átlagos feszültségét és a -30 pA áraminjekció alatt mért utolsó 10 ms-os periódus átlagos feszültségértéke közötti különbséget, és Ohm törvénye alapján megkaptuk a bemenő ellenállást (10. ábra A. panel).
2. Maximális tüzelési frekvenciát a tüskék közötti legrövidebb időtartam mérésével állapítottuk meg, a depolarizáló lépcsők ideje alatt. Általában az első két akciós potenciál közötti szakasz volt a legrövidebb, +120 pA áraminjekciónál.
3. Az átlagos tüzelési frekvenciát az egyes depolarizáló áramlépcsők teljes időtartama (1 s) alatt mért valamennyi akciós potenciál megszámlálásával határoztuk meg.
4. Az akciós potenciál késését (spike latency) a protokoll kezdetéhez képest -60 és -80mV ra állított membránpotenciálon mértük. Ez a protokoll kezdete és az első akciós potenciál megjelenése közötti különbség mérésével történt 100 pA depolarizáló áraminjekció hatására.

5. Az úgynevezett adaptációs indexet (AI) a következő képlet alapján számoltunk: $AI=1-(F_{utolsó}/F_{első})$, ahol az $F_{utolsó}$ az utolsó két akciós potenciál frekvenciáját, az $F_{első}$ pedig az első három akciós potenciál frekvenciáját jelenti (Nigro és mtsai. 2014; 10. ábra B. panel).
6. Alacsony küszöbű tüskék ("low threshold spike", LTS) mérése TTX jelenlétében történt. A depolarizáló áramimpulzus alatt látott átmeneti depolarizáció csúcsa és a depolarizáló lépcső utolsó 100 ms-ában mért átlagos membránpotenciál közötti különbségként határoztuk meg (10. ábra C felső panel).
7. Visszacsapási tüske ("rebound spike") a -30 mV-os hiperpolarizáló áramlépcsőt követő tranziens depolarizáció csúcsa és a feszültséglépcsőt megelőző 100 ms-os időtartamú átlagos feszültségértékeként meghatározott nyugalmi membrán potenciál közti különbségként definiáltuk (10. ábra C panel alsó panel).
8. A magas küszöbű membránpotenciál oszcillációk ("high threshold oscillation", HTO) mérése szintén áram clamp üzemmódban, TTX jelenlétében történt -60 mV-ról 2 s hosszúságú rámpa alakú depolarizáló protokoll alapján, mely során 0 pA áraminjekcióról +800 pA-ig léptünk fel. Értékeljük a depolarizáló lépcsők alatti mérések power spektrumát, valamint meghatároztuk a power maximumhoz tartozó maximális powert és frekvenciát (10. ábra E-F. panel). A legnagyobb amplitúdójú oszcillációk amplitúdóértékének és frekvenciaértékének megismerése céljából a Clampfit programba beépített Fourier transzformáción alapuló műveletet végeztük el, ami a különböző frekvenciájú oszcillációs aktivitásokat képes volt elkülöníteni egymástól. A power spektrum az amplitúdóval arányos érték.

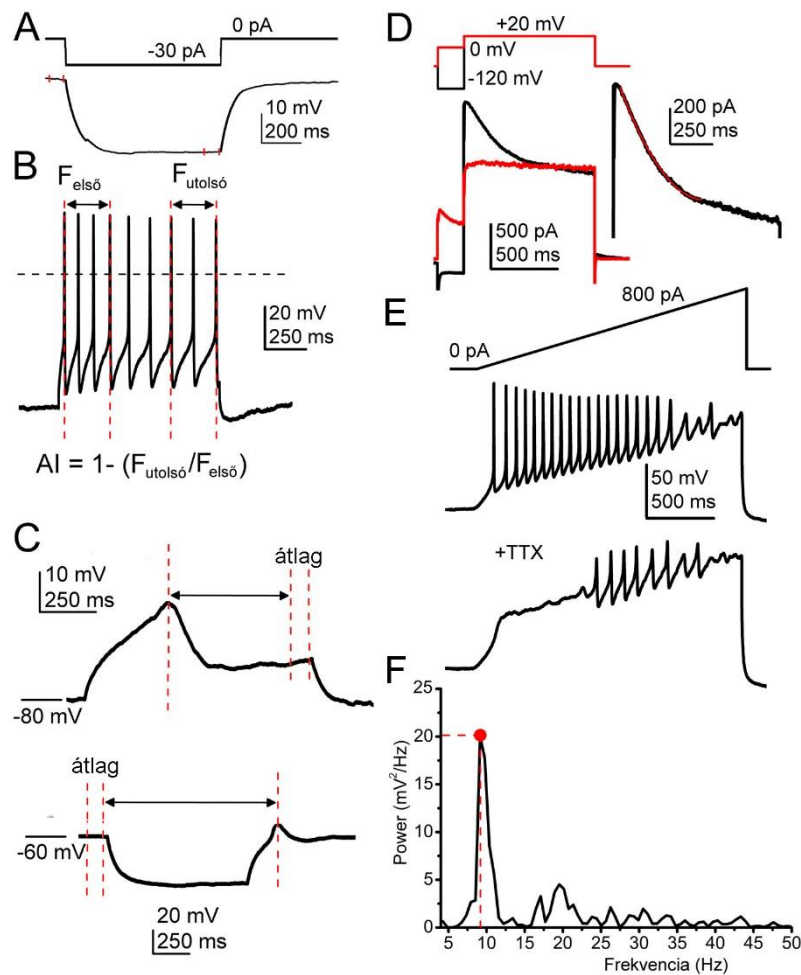
Egyes esetekben szimultán méréseket is végeztünk, az egyik patch pipetta kolinerg neuron szómáján, a másik a proximális dendritjén volt, $29 \pm 4 \mu\text{m}$ távolságba a szómától.

B. Feszültség clamp üzemmódban mértük az ún. A-áramot és az összes orexinfüggő eseményt.

1. Az A-áram egy tranziens kifelé irányuló, feszültségfüggő káliumáram. Méréséhez 1 s hosszúságú, +20 mV amplitúdójú depolarizáló négyszög alakú feszültséglépcsőt alkalmaztunk, melyet egy 200 ms hosszú előimpulzus előzött meg, ahol -120mV áraminjekcióról 10 mV-onként léptünk 0 mV-ig. A tartópotenciált -60 mV-ra állítottuk. A -120 mV-os hiperpolarizáció utáni és a 0 mV depolarizáció utáni depolarizáló feszültséglépcső alatt mért kezdeti áramok különbségeként definiáltuk az A-áram

amplitúdóját. A két áramlépcső közötti különbség adta meg az áramot. Az A-áram leszálló szárát egy exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel megillesztettük, így kaptuk a leszálló szár időállandóját ("decay tau"; (10. ábra D. panel)).

2. Az orexines kísérleteinknél szintén voltage clamp üzemmódot használtuk, -60 mV-os tartópotenciálon végeztünk gapfree méréseket kontroll körülmények között (virtuálisan magnéziummentes n aCSF-ben) 10 percig, ugyancsak 10 percig 200 nmol/l orexin-A jelenlétében, majd 10-20 perc kimosást követően. A SIC-ek és sEPSC-k leszálló szárát egy exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel illesztettük. A SIC-ek általi töltésmozgást a SIC-ek területeként számoltuk ki. A tónusos áramok változásait 1 perc hosszúságú szakaszok hisztogramjainak a felvételével végeztük. A tónusos áram a két hisztogram csúcserkéhez tartozó áramértékek különbsége volt.



10. ábra. A méréseinkhez használt elektrofiziológiai protokollok. A. A bemenő ellenállás meghatározása. Felső panel: protokoll, alsó panel: mért feszültség. B. Az adaptációs index számítása. $F_{\text{első}}$: az első 3 akciós potenciál frekvenciája, $F_{\text{utolsó}}$: az utolsó 2 akciós potenciál frekvenciája. AI: adaptációs index. C. Az alacsony küszöbű tüskék mérése TTX jelenlétében (felső panel), A

visszacsapási tüske mérése (alsó panel). **D.** Az A-áram amplitúdójának és "decay tau"-jának meghatározása. Felső panel: protokoll. Alsó panel: mért áramgörbék. Piros áramgörbe: depolarizáló előlépcsővel mért ára, fekete áramgörbe: hiperpolarizáló előlépcsővel mért áram. Jobbra: különbségi áram (fekete), a leszálló szár egy exponenciális tagot tartalmazó függvényvel történő illesztése (piros). **E.** A magas küszöbű oszcillációk mérése. Felső: az alkalmazott rámpa protokoll. Alsó: n aCSF-ben mért feszültséggörbe TTX nélkül és alatta TTX jelenlétében, mely hatására láthatóvá válnak a magas küszöbű oszcillációk. **F.** Az E. panelen bemutatott oszcillációs aktivitás power spektruma, a maximális powerhez tartozó frekvencia meghatározásának módszerével (piros szimbólumok).

5.4. A neuronok rekonstrukciója

A pipettaoldatba biocitint (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), tettünk, mely a mérés során patchelt sejtek belsejébe jutott. A mérés után a szeleteket fixáltuk egy éjszakán keresztül 4 °C-on, amelyhez 4%-os paraformaldehid oldatot használtunk (0,1 mol/l foszfát pufferben; pH 7,4). Ezután a feltárást 60 percen keresztül Tris-pufferolt sóoldatban végeztük (8 mmol/l Tris bázis, 42 mmol/l Trizma HCl, 150 mmol/l NaCl, pH 7,4), melyet 0,1% Triton-X-100-zal és 10% szarvasmarha szérummal egészítettünk ki a permeabilizálás céljából. Ezután a szeleteket Alexa 488 konjugált streptavidinnel (1:300; Molecular Probes Inc, Eugene, OR, USA) foszfát pufferben inkubáltuk 90 percen keresztül.

A sejtekről Zeiss LSM 510 konfokális mikroszkóp (Carl Zeiss AG) segítségével készítettünk felvételeket. A sejtek rekonstruálása NeuroLucida szoftver segítségével történt (MBF Bioscience, Williston, VT, USA). A neuronok funkcionális sajátosságainak ábrázolásához három dimenziós topográfiai térképet készítettünk a Paxinos atlasz alapján (Paxinos és Franklin, 2013). A három dimenziós blokk rekonstruálásához, az agytörzs kontúrjának és az aqueductus cerebri körvonalának megrajzolásakor a Paxinos atlasz kontúrvonalait és paramétereit vettük alapul. A jelölt neuronok sejttestjeit pedig különböző színű gömbökkel jelöltük. A gömbök különböző színei eltérő funkcionális paraméterekre utalnak, melyeket az eredmények című fejezetben részletesen kifejték. A neuronok szómáját és a dendritfáit kirajzoltuk. A rekonstrukció után kiszámítottuk a szóma legnagyobb átmérőjét, dendritek számát, elágazódások számát, a dendritek teljes hosszát, dendrittüskék meglétét és hiányát, valamint a dendritek orientációját. Az axon teljes lefutása viszonylag kevés esetben volt vizsgálható, mert hamar kilépett a coronalis szelet síkjából, így csak rövidelvágot axonokat láttunk.

5.5. Kolin acetiltranszferáz immunhisztokémia

Három esetben kolin acetiltranszferáz immunhisztokémiát végeztünk idősebb (3-6 hónapos) transzkardiálisan perfundált Chat-tdTomato egerekből preparált szeleteken. Az agymintákat 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk 24 órán keresztül, majd 80 μ m vékony koronális szeleteket készítettünk vibratóm segítségével. 3x10 percen keresztül átmostuk a szeleteket Tris-pufferolt sóoldattal (TBS), majd 10%-os Triton X-100 és 0,5% szarvasmarha szérum hozzáadásával egy órán keresztül hagytuk állni. A szeleteket 1:75 arányú nyúl anti-kolin acetiltranszferáz primer antitesttel (Millipore, Temecula, CA, USA) inkubáltuk 48 óráig. Ezt követően kecskében termelt nyúl elleni Alexa 488 antitestet (Vector Laboratories Inc. Burlingame, CA, USA) használtunk további 24 órán keresztül. A protokoll elvégzése után konfokális mikroszkóppal készítettünk rétegfelvételeket. A tdTomato expresszió és a ChAT immunpozitivitás átfedéseinek megítélése manuálisan történt, megszámlálva azoknak a neuronoknak a számát, melyek piros és/vagy zöld fluoreszcenciát mutattak.

Az adatokat az átlag \pm SEM formában tüntettük fel. Az adatok normál eloszlását D'Agostino és Pearson omnibus normál teszt segítségével határoztuk meg. A statisztikai szignifikanciát a Student-féle kétmintás t-próba segítségével határoztuk meg, amennyiben az adatok normál eloszlást mutattak; más esetekben pedig a Kolmogorov-Smirnov féle tesztet használtuk. Többszörös összehasonlításokhoz Bonferroni többszörös összehasonlító tesztjét használtuk, illetve a kétszemponos ANOVA Mann-Whitney tesztjét. A szignifikancia szintje $p < 0,05$. Pearson korrelációs koefficiens (R) két független adat közötti lineáris korreláció kimutatására alkalmaztuk.

6. EREDMÉNYEK

6.1. A PPN kolinerg neuronok funkcionális alcsoportjainak vizsgálata

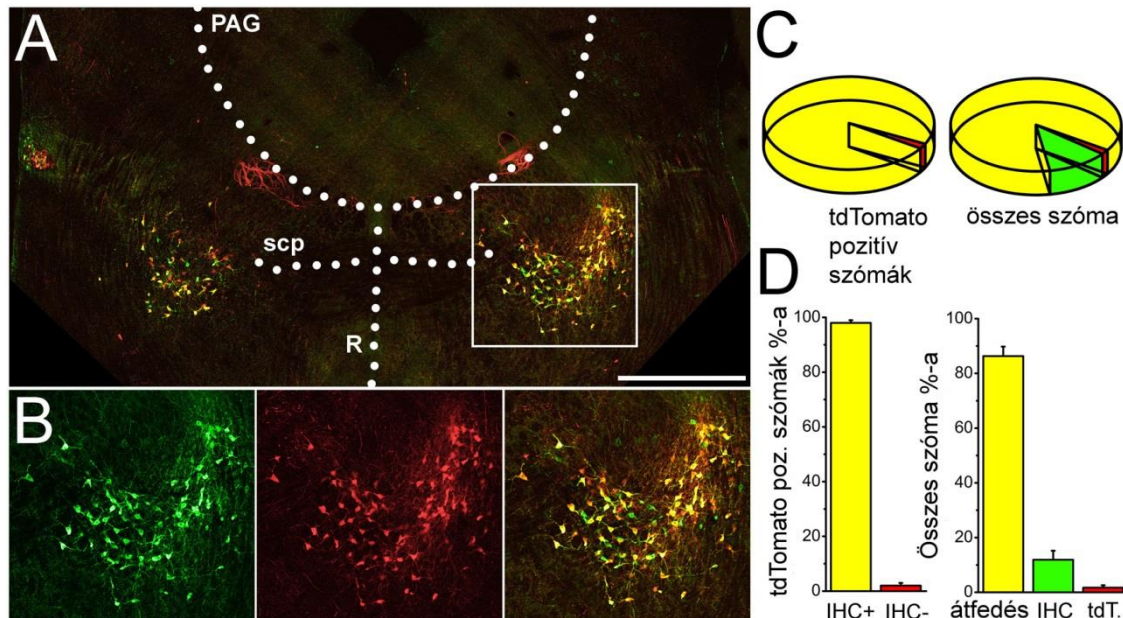
A PPN kolinerg neuronjainak többféle funkcionális csoportosítása létezik. Az *in vivo* csoportosítás maximális tüzelési frekvenciájuk vagy a kortikális aktivitáshoz való viszonyuk szerint csoportosítja a PPN neuronjait, míg az *in vitro* csoportosítás bizonyos membránsajátságok (A-áram, alacsony küszöbű kalciumtűskék) megléte vagy hiánya szerint. Az alábbi kutatások célja a korábbi *in vitro* csoportosítás újbóli, transzgén technikákra alapuló vizsgálata, újabb csoportosítási lehetőségek feltárása és a morfológiai és funkcionális paraméterek korreláltatása volt.

6.1.1. A kolinerg neuronok azonosítása

Mivel a ChAT-függő tdTomato expresszió lehet a következménye a kolin acetiltranszferáz gén ideigkenes aktivációjának is a fejlődés egy korai stádiumában, fontos volt annak vizsgálata, hogy a tdTomato pozitív neuronok valóban kifejezik-e a kolin acetiltranszferázt. Ennek a kérdésnek eldöntésért ChAT-tdTomato mintákon ChAT immunhisztokémiát alkalmaztunk. A vizsgálatot 3 db ChAT-tdTomato egeren végeztük, összesen 12 db, a PPN-t tartalmazó szeletben 379 sejttest elemzésével. Eredményeinkben a ChAT immunpozitivitás és tdTomato expresszió jelentős mértékben átfedett. Az összes tdTomato pozitív sejttest $98 \pm 1\%$ -a bizonyult ChAT pozitívnek. A fennmaradó $2\% \pm 1\%$ ChAT immunnegatív szóma érdekes módon a PPN széle felé lokalizálódott. Abban az esetben, ha az összes olyan sejttestet figyelembe vettük, ami valamiképpen jelölődött a PPN-en belül (azaz vagy tdTomato-t expresszált, vagy ChAT-immunopozitívnek bizonyult), akkor a vizsgált sejttestek $86,8\% \pm 3,5\%$ -ban mutattak átfedést a ChAT immunpozitivitás és a tdTomato expresszió között. A vizsgált sejttestek $11,9 \pm 3,3\%$ -a csak ChAT immunpozitív volt, míg $1,76\% \pm 0,9\%$ mutatott kizárólag tdTomato expressziót.

Mindezek alapján a tdTomato expresszió egy megfelelő markernek bizonyul, mely jól alkalmazható a kolinerg neuronok azonosítására, elhanyagolható lehetőséget hagyva a negatív vagy pozitív hibáknak. Későbbi funkcionális kísérleteink során természetesen nem vettük figyelembe azokat a neuronokat, melyek a tdTomato expresszió nem volt látható.

Eredményeink értékelésekor azonban figyelembe kell vennünk, hogy a vizsgált neuronok között kis százalékban lehetnek olyanok, melyik nem kolinerg neuronok, mégis kifejeződött bennük a tdTomato fehérje. Annak érdekében, hogy minél inkább elkerüljük a fals pozitív kolinerg neuronokat, nem mértünk azokon a szómákon, melyek a PPN széli területén helyezkedtek el (11. ábra).



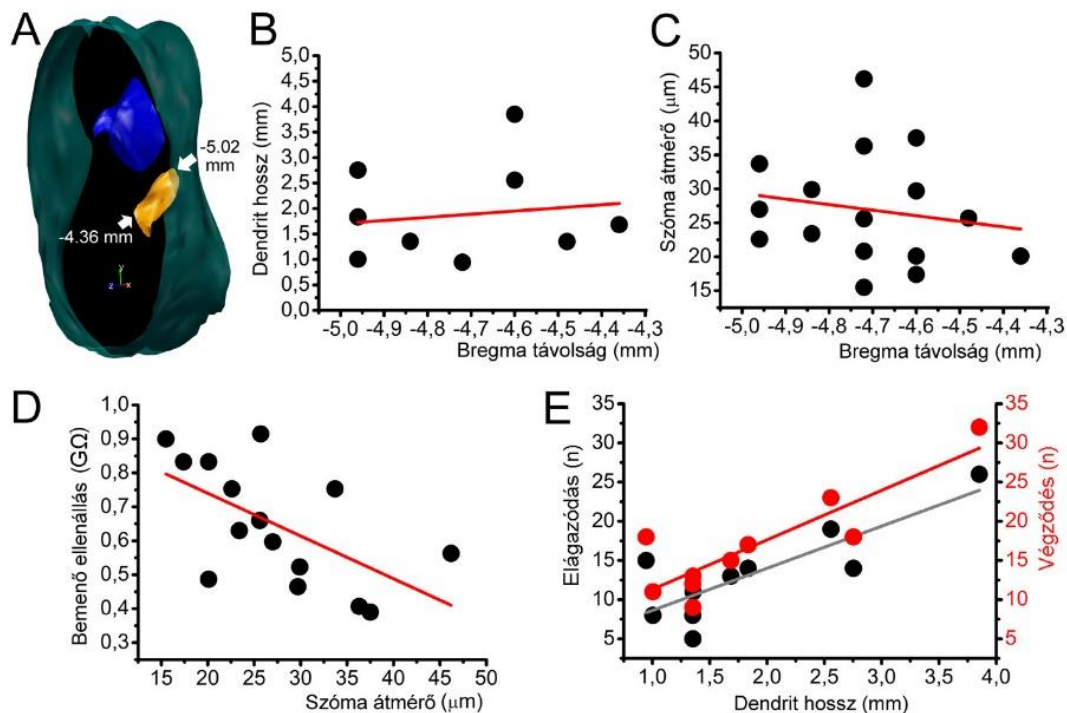
11. ábra. A kolinerg neuronok funkcionális vizsgálatához használt minták morfológiai elemzése. **A.** ChAT-tdTomato egérből származó koronális metszet ChAT immunhisztokémia jelölés után. Piros: tdTomato, zöld: ChAT immunopozitivitás, PAG: periaqueductalis szürke állomány, scp: pedunculus cerebellaris superior, R: nucleus raphe dorzális és medianus. Kalibráció: 1mm. **B.** Az A panelen négyzettel körülhatárolt terület kinagyított képe. **C.** A különböző jelölésű szómák kördiagramon való ábrázolása (sárga: tdTomato- és immunopozitív szómák, piros: csak tdTomato pozitív szómák, zöld: csak ChAT-immunopozitivitást mutató szómák) A bal oldali diagrammon csak a tdTomato pozitív szómákat, jobb oldalon valamennyi szómát figyelembe vettük. **D.** A különböző típusú szómák arányainak statisztikai elemzése, a C panelnek megfelelő elrendezésben.

6.1.2. A kolinerg neuronok morfometriai elemzése

A mérések során a neuronokat biocitinnel jelöltük. Ez lehetőséget adott arra, hogy a vizsgált neuronokat rekonstruáljuk és azok morfológiai elemzését elvégezzük. 14 neuron esetében a teljes szomato-dendritikus domén rekonstruálása lehetséges volt, ezeken végeztük el az alábbi vizsgálatokat. Eredményeink a következők voltak:

A szomato-dendritikus morfológiai paraméterek (mint a dendritok száma, hossza és orientációja, a szóma legnagyobb átmérője, dendrittűskék esetleges megléte) nem mutattak összefüggést a sejttest rostrocaudális elhelyezkedésével ($R^2 = -0,1$; 12. ábra, B-C). Ehhez hasonlóan a különböző szomato-dendritikus morfológiai vagy funkcionális paraméterek között nem találtunk lineáris korrelációt. Ez alól két kivétel volt, melyek az irodalomból jól ismert vagy egyértelmű összefüggések:

1. A bemenő ellenállás és a szóma átmérője közötti kapcsolat. Minél nagyobb a szóma, annál kisebb a bemenő ellenállás ($R^2 = 0,31$; 12. ábra, D).
2. Lineáris korreláció a teljes dendrit hossz és a dendrit elágazások és végződések között. Minél hosszabb a dendrit, annál több elágazás és végződés van rajta. ($R^2 = 0,63$ és $0,71$; 12. ábra, E)



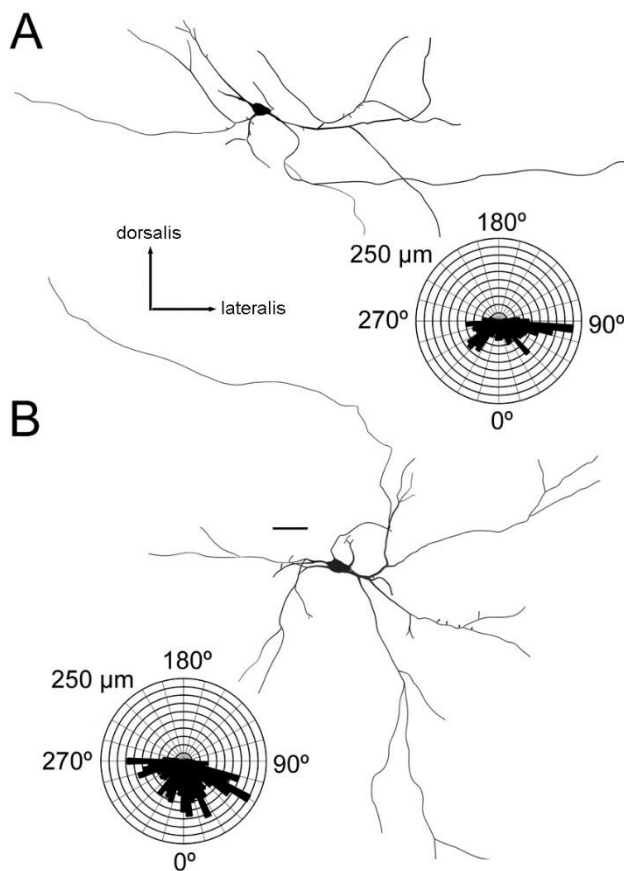
12. ábra. A morfológiai, topográfiai és funkcionális paraméterek korrelációinak vizsgálata. **A.** A PPN elhelyezkedésének átnézeti képe. A nyilak és a számok a bregmától való távolságot jelzik a Paxinos-atlasz (Paxinos és Franklin, 2013) alapján. **B.-C.** A dendrit hossz és a szóma átmérő nem korrelált a szóma rostrocaudális elhelyezkedésével. **D.** A szóma átmérője a bemenő ellenállással fordítottan arányos. **E.** A dendrit elágazódások és végződés száma egyenesen arányos a dendrit hosszával.

A szómák átlagos legnagyobb átmérője $27,04 \pm 1,79 \mu\text{m}$ ($20,1$ -től $37,5 \mu\text{m}$ -ig) volt. Az átlagos szóma terület $276,9 \pm 27,4 \mu\text{m}^2$ -nek (162 - $372,5 \mu\text{m}^2$), míg az átlagos össz dendrit hossz

1869,42 ± 291 μm-nek (945,8 μm- 3852,1 μm) bizonyult. A vizsgált neuronok 3-6 elsődleges dendrittel (3,8 ± 0,29), 5-26 dendrit elágazással (13,3 ± 1,9), és 9-32 dendrit végződéssel (16,8 ± 2,13) rendelkeztek. A vizsgált neuronok 28,6% rendelkezett dendrit tüskékkel (2,4 ± 1,25).

A szómákból kiinduló dendritek orientációjának vizsgálata 17 rekonstruált neuron esetében történt. Ezek közül 4 neuron bipoláris dendritfával rendelkezett, ahol a két leghosszabb nyúlvány ellentétes irányba rendeződött. A többi neuron multipoláris jellegű volt a dendrit nyúlványok tekintetében, ahol a dendritek a tér minden irányába rendeződtek el (13. ábra). A dendritnyúlványok orientációja és a neuronok funkcionális paraméterei között nem találtunk összefüggéseket. Ez alól egy kivételt találtunk, mely az alacsony küszöbű kalciumtüskék jelenlétének és a dendritek orientációjának összefüggése (ld. alább).

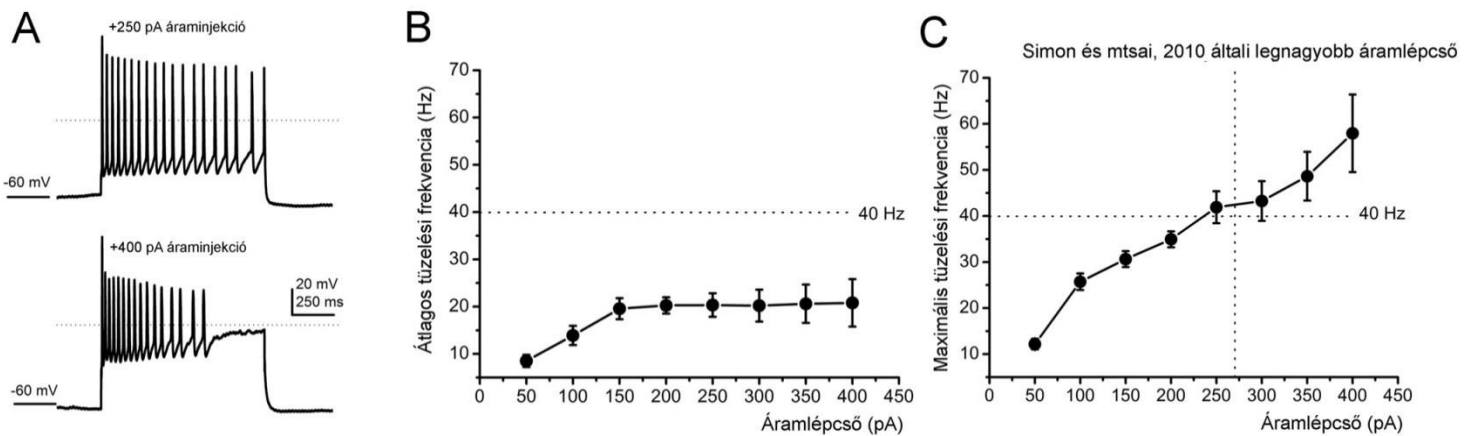
Összegezve legfontosabb eredményeinket elmondhatjuk, hogy a kolinerg neuronok szomatodendritikus tulajdonságai általában függetlenek egymástól és a legtöbb funkcionális tulajdonságtól is. Fontos azonban kiemelnünk, hogy a szelet-elektrofiziológiai preparátumban az axonoknak csak kis darabjai láthatóak, így az axon lefutásban a funkcionális csoportok között lehetnek potenciális különbségek.



13. ábra. Két példa bipoláris és multipoláris neuronra. A. Bipoláris neuron rekonstrukciója és poláris hisztogramja. **B.** Multipoláris neuron. Kalibráció: 50 μm.

6.1.3. Neuronok csoportosítása *in vitro* funkcionális tulajdonságok alapján

Annak érdekében, hogy megfelelően válasszuk meg a PPN neuronok tüzelési mintázatának vizsgálatához használt protokollt, előkísérleteink során 400 pA-ig alkalmaztunk depolarizáló lépcsőket. Az átlagos tüzelési frekvencia 150 pA-es depolarizáló lépcsőig növekedett, utána állandó maradt. A maximális tüzelés frekvencia folyamatosan nőtt, és a 250 pA-es depolarizáló lépcsőtől kezdve valamennyi neuron –típustól és elhelyezkedéstől függetlenül- 40 Hz tüzelési frekvencia felett tüzelt. Ezt az előkísérletet és azt a tényt, hogy 120 pA feletti szinaptikus eseményt csak elvéve regisztráltunk PPN neuronon (Kovács és Pál, 2017), elvetettük az egyes szerzők által alkalmazott, 270 pA-es depolarizáló lépcsőig elmenő áram clamp protokollt (Simon és mtsai. 2010), és a maximális depolarizáló lépcsőt 120 pA-ben határoztuk meg, hogy elkerüljük artefaktumok rögzítését és interpretációját, valamint a fizioiógias aktiváció tartományában maradjunk (14. ábra).



14. ábra. A maximális depolarizáló áramlépcső meghatározását célzó előkísérletek. **A.** 250 és 400 pA depolarizáló lépcső hatására keletkező tüzelési mintázatok. **B.** Nagy amplitúdójú depolarizáló impulzusok hatására kialakuló átlagos tüzelési frekvencia. **C.** Nagy amplitúdójú depolarizáló impulzusok hatására kialakuló maximális tüzelési frekvencia.

Összesen 91 genetikailag azonosított kolinerg neuront soroltuk az alábbi 4 alcsoportba (ld. még 2. táblázat):

1. **I típusú neuronok:** alacsony küszöbű depolarizációs (LTS) és visszacsapási tüskével rendelkeztek, azonban A-áram és az első akciós potenciál hiperpolarizáció indukálta késése nem jellemezte ezeket a neuronokat.
2. **II típusú neuronok:** A-árammal rendelkeztek, valamint hiperpolarizáció indukálta késés jellemezte őket. LTS nem volt megfigyelhető esetükben.
3. **III típusú neuronok:** LTS és A-áram/hiperpolarizáció indukálta késés együttesen jellemezte őket.
4. **IIIK típusú neuronok:** egyik tulajdonsággal sem rendelkeztek. A "K" rövidítés a Kang és Kitai (1990) eredetileg definiált III. csoportjára utal.

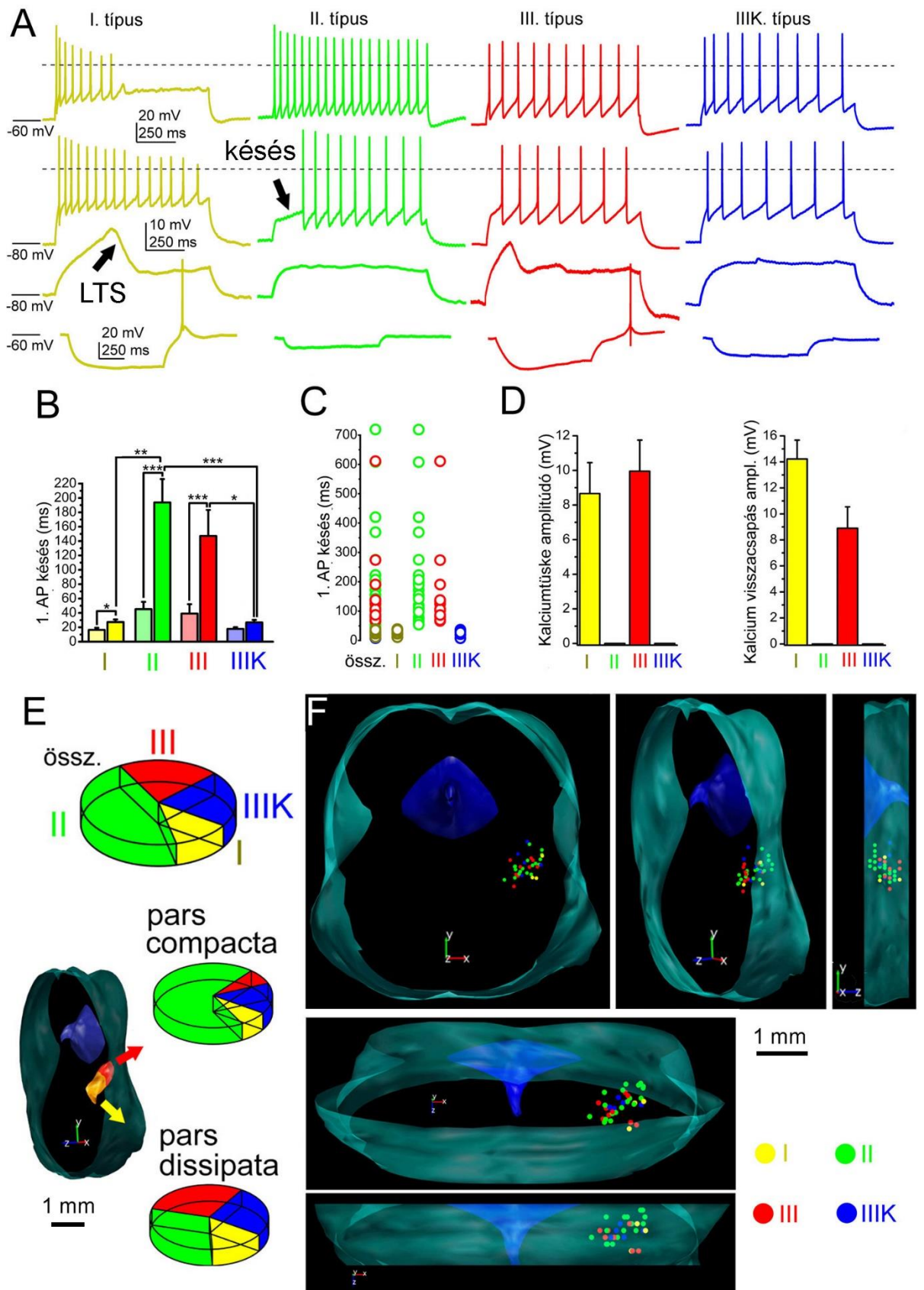
Az LTS és a visszacsapási tüske jelenlétét vagy hiányát, valamint az első akciós potenciál 100 pA depolarizáló lépcső hatására -80 mV-os tartópotenciálról indulva késését figyeltük meg. Abban az esetben, ha a stimulus kezdetéhez képest az első akciós potenciál késése kevesebb, mint 50 ms volt (11,3 ms- 39 ms), de LTS jelen volt, a neuronokat I. típusba soroltuk (n = 12; 13,18%). A II. típusba soroltuk azokat a neuronokat, melyek esetében LTS nem fordult elő, de a stimulus kezdetéhez képest az első akciós potenciál több mint 50 ms (53,4 ms- 718,9 ms) késéssel jelent meg (n = 44; 48,35%). Ha LTS és akciós potenciál késése is jellemezte a neuront, a III. típusba soroltuk (a késés intervalluma 66,8 ms- 611 ms; n= 19; 20,88%). Azokat a neuronokat, melyek egyik tulajdonsággal sem rendelkeztek, a IIIK. típusba soroltuk (késés intervalluma 7,9 ms- 36,8 ms. n= 16; 17,58%).

A továbbiakban a -60 mV és -80 mV tartópotenciálról kiinduló, 100 pA depolarizáló lépcső alatt mért akciós potenciál késési eredményeket hasonlítottuk össze. A vizsgálat során szignifikáns növekedést figyelhattunk meg minden csoport esetében. Az I. típusú neuronok esetében a késés $16,34 \pm 2,66$ ms-ról $29,2 \pm 3,44$ ms-ra nőtt ($p = 0,02$). A II. típusú neuronoknál a késés ideje $46,1 \pm 10,33$ ms-ról $199,63 \pm 32,05$ ms-ra változott ($p < 0,001$). A III. típusú neuronok esetében $39,1 \pm 13,1$ ms-ról $147,1 \pm 36,3$ ms-ra nőtt ($p < 0,001$), IIIK típusú neuronoknál pedig $17,7 \pm 2,4$ ms-ról 3,6 ms-ra emelkedett az akciós potenciál megjelenése a stimulus kezdetéhez képest. A IIIK. típusnál a növekedés nem volt szignifikáns. Azoknál a neuronoknál, melyeknél az LTS és a visszacsapási tüske hiányzott, kevesebb, mint kétszeres növekedést figyelhattunk meg a késésben. Ez a tulajdonság valószínűleg csupán az adott neuronok passzív membránsajátságainak köszönhető (n = 29). Azoknál a csoportokban, ahol inaktíváló transziens depolarizáló áram volt jelen (és az inaktívációját a hiperpolarizáció megszüntette), 3-5-szörös növekedést figyelhattunk meg (n = 65). Az egyes neuronális csoportok késése jelentősen különbözött (I-II, $p = 0,002$; II-IIIK, $p = 0,0006$; III-IIIK, $p = 0,045$).

Összhangban az eredeti csoportosítási kritériumokkal, az I típusú neuronok LTS amplitúdója $9,98 \pm 2,1$ mV és a visszacsapási tüske amplitúdója $14,1 \pm 1,3$ mV volt ($n = 12$). III típusú neuronok esetében ($n = 19$) az LTS amplitúdója $9,9 \pm 1,8$ mV volt, a visszacsapási tüske amplitúdója $8,9 \pm 1,6$ mV volt. A II. és III. típusú neuronok nem rendelkeznek LTS-sel vagy visszacsapási tüskével/tüzeléssel (II. típus $n = 44$; IIIK. típus $n = 16$).

33 neuron esetében tudtuk egyértelműen meghatározni a szóma rostrocaudalis lokalizációját. Ezek közül 12,12% ($n = 4$) I. típusú neuron, 45,45% ($n = 15$) II. típusú, 21,21% ($n = 7$) III. típusú, és szintén 21,21% ($n = 7$) IIIK. típusú neuron volt.

A PPN caudalis, pars compacta részén 13 neuront azonosítottunk ($n = 13$). Ezen területen a II. típusú neuronok domináltak 69,2%-ban ($n = 9$). Az I. és a III. típusú neuronok azonos számban képviselték magukat 7,69-7,69% ban ($n = 1-1$). Ezeken felül IIIK. típusú neuronok 15,38%-ban voltak megfigyelhetők ($n = 2$). A PPN rostralis részén 20 neuront azonosítottunk ($n = 20$). A különböző neuroncsoportok a megoszlása a következő volt: I. típusú neuronok csoportja 15%-ban ($n = 3$), II. típusú neuronok csoportja 30%-ban ($n = 6$), III. típusú neuronok 30%-ban ($n = 6$), és IIIK. típusú neuronok csoportja 25%-ban ($n = 5$) képviseltette magát (15. ábra, A-D).

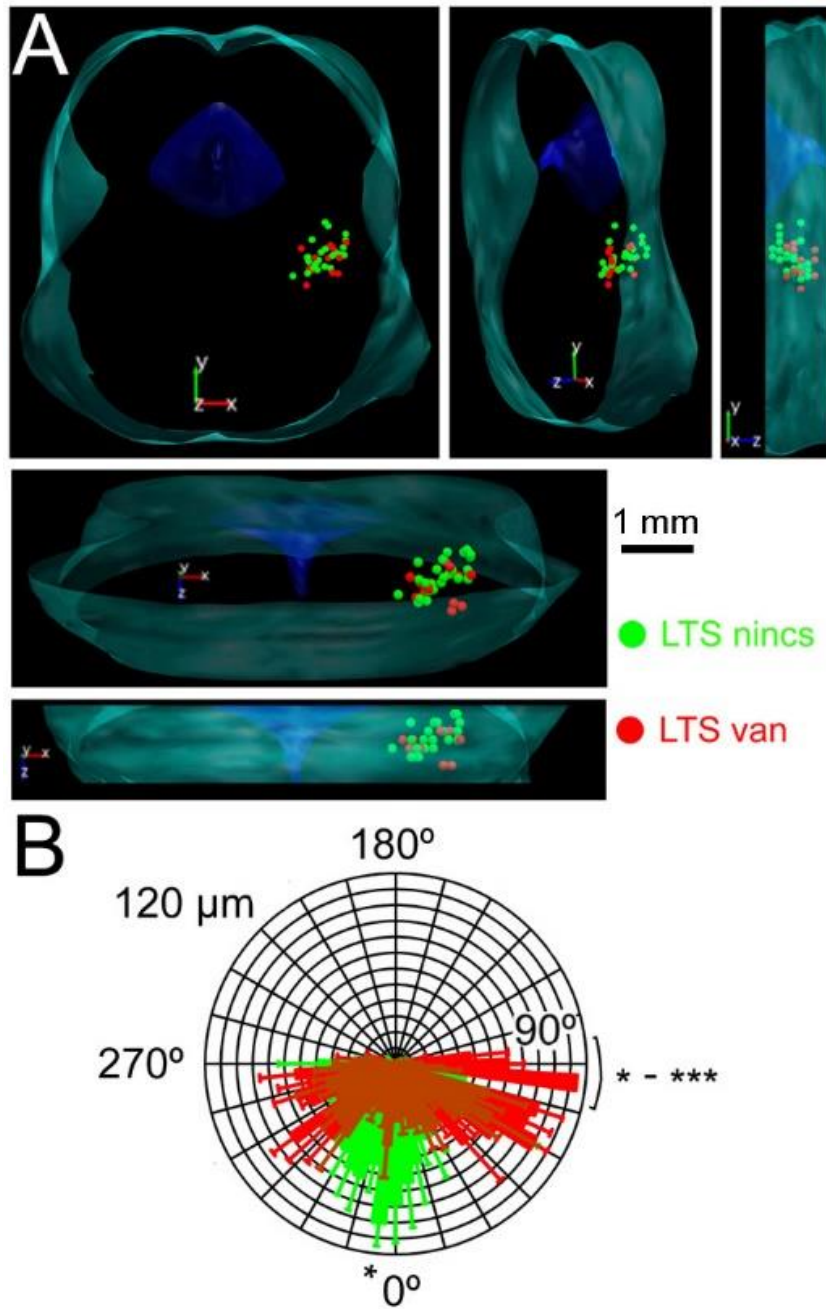


15. ábra. A PPN neuronok klasszikus funkcionális csoportosítása. Leírást ld. következő oldalon.

15. ábra. A PPN neuronok klasszikus funkcionális csoportosítása. A. Elterő funkcionális tulajdonságokkal rendelkező kolinerg neuronok tüzelési mintázata. (I. típus: sárga, II. típus: zöld, III. típus: piros, IIIK. típus: kék). Felső sor: -60 mV nyugalmi membránpotenciál, 100 pA depolarizáló áraminjekció, második sor: -80 mV nyugalmi membránpotenciál, 100 pA depolarizáló áraminjekció. Harmadik sor: -80 mV nyugalmi membránpotenciál, 30 pA depolarizáló áraminjekció. Alsó sor: -60 mV nyugalmi membránpotenciál, -30 pA hiperpolarizáló áraminjekció és visszacsapási tüske és tüzelés. A szaggatott vonalak a 0 mV-ot jelzik. **B.** 100 pA áraminjekcióval kiváltott akciós potenciálok a stimulus kezdetéhez viszonyított késése, az ebből kapott adatok statisztikai összehasonlítása. A színek megegyeznek a korábbi jelölésekkel. A világosabb színű bal oldali oszlopok a -60 mV-os, míg a jobb oldali sötétebb színű oszlopok a -80 mV-os nyugalmi membránpotenciál értéken felvett adatokat mutatják (átlag \pm SEM).

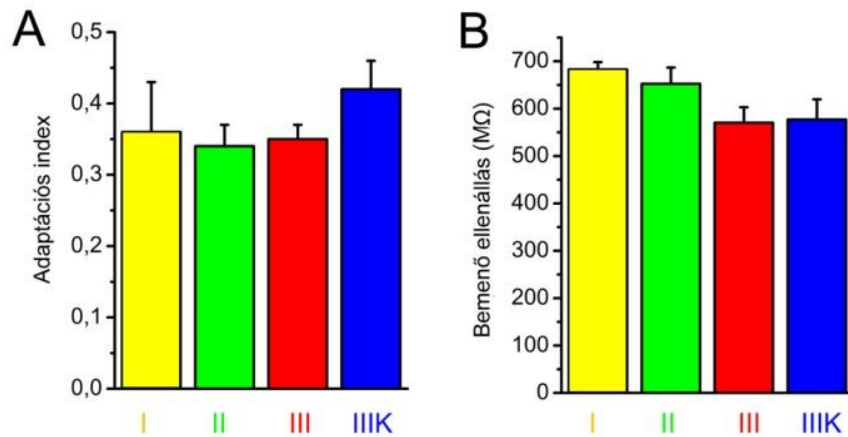
C. Az első akciós potenciál megjelenésének késése egyéni adatokkal -80mV nyugalmi potenciálról indulva. **D.** Az LTS és a visszacsapási tüske maximális amplitúdójának statisztikai összehasonlítása. A színek szintén megegyeznek a korábbiakkal. **E.** A különböző funkcionális tulajdonságokkal rendelkező kolinerg neuronok aránya a PPN-ben, illetve a pars compacta és a pars dissipata területén. **F.** A különböző kolinerg alcsoportok megoszlása a PPN- ben, különböző térbeli nézetekben. (I. típus: sárga, II típus: zöld, III. típus: piros, IIIK típus: kék).

A PPN pars compacta részében azok a neuronok, melyek LTS-sel vagy visszacsapási tüskével vagy tüzeléssel rendelkeznek (I. és III. típus), viszonylag kevés számban képviseltették magukat. Mindösszesen az itt azonosított neuronok 15,4%-a ($n = 2$) rendelkezett ezen tulajdonságokkal, míg a pars dissipata részben ez az arány 47,3% ($n = 9$; 15. ábra, E-F). Érdekes módon az LTS jelenléte vagy hiánya szignifikáns összefüggést mutatott a dendritek különböző orientációjával. Az LTS-sel rendelkező neuronok bipoláris dendritfával rendelkeztek, míg azok a neuronok, melyekre nem volt jellemző LTS, azok inkább multipoláris jellegűek voltak (16. ábra).



16. ábra. Alacsony küszöbű depolarizációs tüskével (LTS-sel) rendelkező vagy nem rendelkező PPN kolinerg neuronok morfológiai összehasonlítása. A. LTS-sel rendelkező illetve nem rendelkező kolinerg neuronok megoszlása különböző térbeli elrendezésű térképeken ábrázolva. Piros LTS-sel rendelkező, zöld: LTS nélküli neuron. Az LTS-sel rendelkező neuronok nagyrészt a PPN rostralis területén helyezkedtek el. **B.** LTS-sel rendelkező (piros) és nem rendelkező (zöld) neuronok poláris hisztogramjainak átlaga. Az ábrázolt csillagok a szignifikancia szintjét jelzik, (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0,001$.

A bemenő ellenállás és adaptációs index nem különbözött szignifikánsan az egyes alcsoportok között (17. ábra).



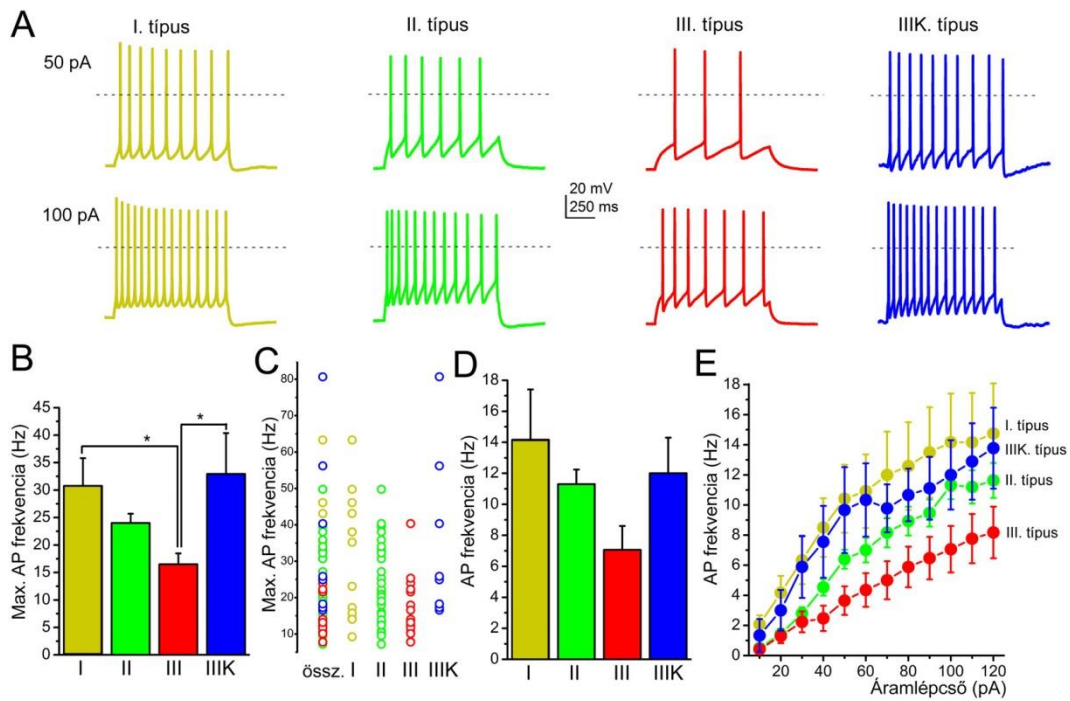
17. ábra. Az egyes alcsoportok adaptációs indexének (A) és bemenő ellenállásának (B) statisztikai összehasonlítása. Az egyes alcsoportok között nem láttunk szignifikáns különbséget ezen paraméterekben.

A továbbiakban az egyes funkcionális csoportok maximális és átlagos akciós potenciál tüzelési frekvenciát tüzelési frekvenciáit hasonlítottuk össze ($n = 91$). A III. típusú neuronok tüzeltek leglassabban, szignifikánsan kisebb volt a maximális frekvenciájuk, mint az I. és a IIIK. csoportok esetén. A maximális tüzelési frekvencia III. típusú neuronok esetében $16,49 \pm 1,99$ Hz, I. típusúak esetében $30,76 \pm 5,04$ Hz, II. típusú neuronoknál $23,99 \pm 1,69$ Hz és IIIK. típus esetében pedig $32,94 \pm 7,44$ Hz volt (I-III, $p = 0,031$; III-IIIK, $p = 0,02$).

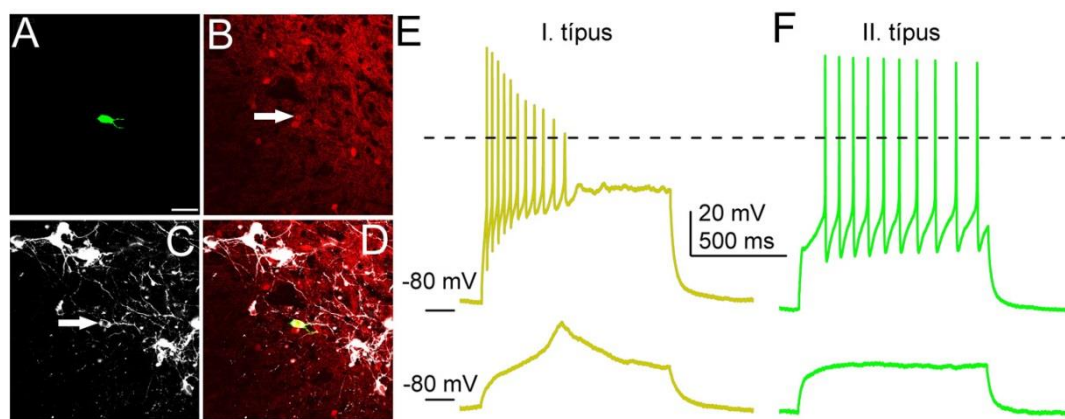
Hasonló tendenciát találtunk az átlagos tüzelési frekvencia esetében. Az átlagos tüzelési frekvencia 100 pA áraminjekció hatására III. típusú neuronok esetében $7,06 \pm 1,54$ Hz volt, I. típusú neuronoknál $14,16 \pm 3,24$ Hz, II. típusú neuronok esetében $11,3 \pm 0,94$, és IIIK. típus esetében pedig $12 \pm 2,3$ Hz. Ebből láthattuk, hogy a III. típusnál számszerűen, de nem szignifikánsan kisebb értékeket kaptunk (18. ábra).

Jól ismert az a tény, hogy a kolínérg neuronok egy kisebb alpopulációja glutamátot és acetilkolinot is felszabadít. Annak érdekében, hogy ellenőrizzük, vajon ezek a neuronok egy külön funkcionális csoporthoz tartoznak-e, 67 Vglut2-tdTomato marker pozitív neuront vizsgáltunk szintén patch clamp technikával. Az utólagos ChAT immunhisztokémia segítségével 3 ChAT pozitív neuront találtunk (4,47%). Ezek közül egy neuron tartozott az I.

típusok közé, míg a másik két neurontípust a II. csoportba soroltuk. Bár ilyen kis szám esetén nem tudjuk pontosan meghatározni az arányukat, de azt a következtetést levonhatjuk, hogy a glutamaterg-kolinerg neuronok nem azonosíthatóak egyetlen határozott funkcionális sejtípussal (19. ábra).



18. ábra. Az átlagos és maximális tüzelési frekvenciák összehasonlítása az egyes funkcionális csoportok között. **A.** 50 pA (felső sor) és 100 pA (alsó sor) áraminjekcióval kiváltott akcióspotenciálsorozatok az egyes típusok esetén (színkódot ld. 15. ábra). **B.** A maximális tüzelési frekvencia statisztikai összehasonlítása az egyes csoportok között. **C.** Az individuális maximális tüzelési frekvencia adatok bemutatása. **D.** Az átlagos tüzelési frekvencia statisztikai összehasonlítása az egyes csoportok között. **E.** Az átlagos tüzelési frekvencia növekedése az egyes típusok esetén. Az oszlopdiagramokon ábrázolt csillagok a szignifikancia szintjét jelzik, (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0,001$.



19. ábra. A glutamaterg-kolinerg populáció vizsgálata. A-D. Egy glutamaterg-kolinerg neuron azonosítása (A, zöld: biocitin jelölés; B, piros: Vglut2-függő tdTomato expresszió; C, fehér: ChAT immunhisztokémia, nyíl: a vizsgált neuron szómája, kalibráció: 50 μ m). E-F. Példák a glutamaterg-kolinerg neuronok membránsajátságaira és csoportosítására (felső sor -80 mV-os nyugalmi membránpotenciálról alkalmazott 100 pA-es, alsó sor: 30 pA-es depolarizáló áraminjekció).

6.1.4. Korai és késői tüzelésű neuronok a PPN-ben

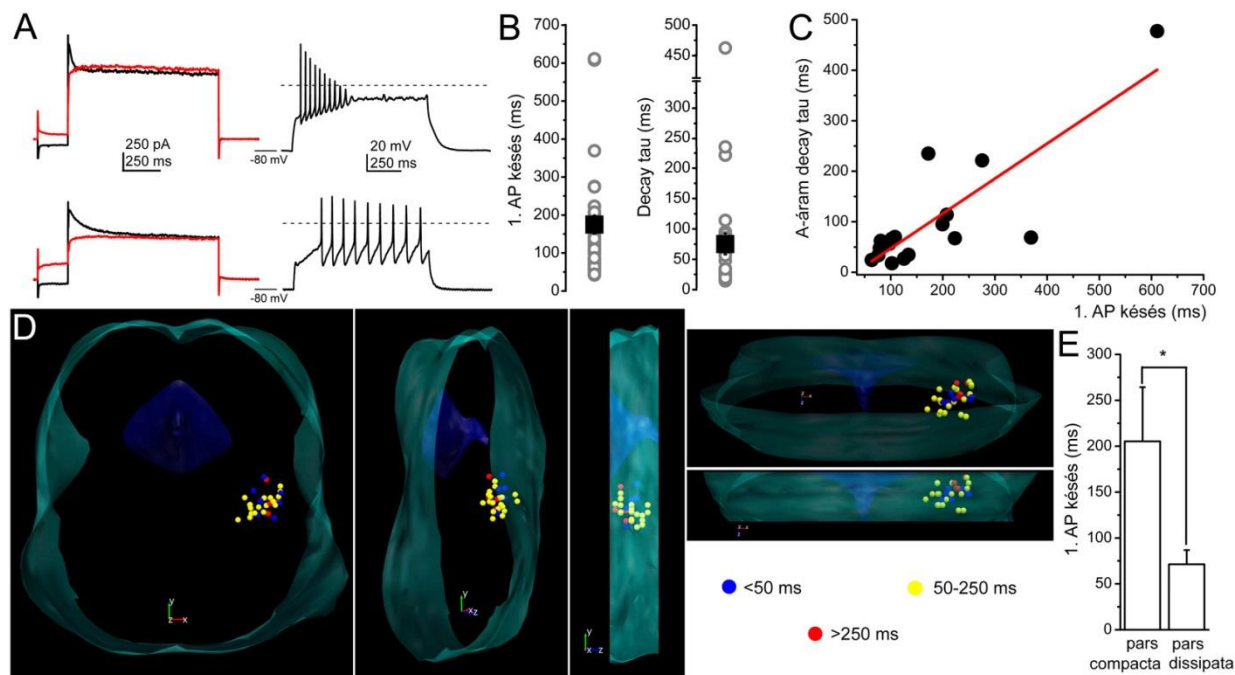
További kísérleteink során azokra a neuronokra fókuszáltunk, melyek esetében hiperpolarizált nyugalmi membránpotenciálon (-80 mV-on) 50 ms-nál nagyobb tüzelési késést tapasztaltunk. Elsőként azt próbáltuk igazolni, hogy a tranziens kifelé irányuló áram felelős az akciós potenciál késéséért. Ehhez áram clamp üzemmódban 100 pA négyszög alakú áraminjekciót alkalmaztunk -80 mV-ról, mellyel akciós potenciál sorozatot váltottunk ki. A késés ebben az esetben $174,57 \pm 24,7$ ms (57,3- 718,9 ms) volt. Ezt követően TTX jelenlétében, feszültség clamp elrendezésben depolarizáció aktiválta kifelé irányuló áramot tudtunk mérni hiperpolarizáló és depolarizáló előimpulzusokkal (ld. Eszközök és módszerek, 10. ábra). A tranziens kifelé irányuló áram leszálló szárát illesztettük egy exponenciális tagot tartalmazó függvényvel, ahol a decay tau $75 \pm 17,5$ ms (14,3 - 477,4 ms) volt. Erős lineáris korrelációt találtunk abban az esetben, ha ugyanazon neuron ($n = 18$) A-áramának decay tau értékét az akciós potenciál késésének függvényében ábrázoltuk (meredekség = 0,69; $R^2 = 0,67$). Az akciós potenciálók késésének értékeinek térbeli megoszlását is vizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy a hosszabb késéssel (> 250 ms) rendelkező neuronok inkább caudalisan helyezkedtek el, míg kisebb késési idővel a rostralisán elhelyezkedő neuronok rendelkeztek.

Az átlagos késési idő a pars compactaban $205,3 \pm 59$ ms, míg a pars dissipataban lévő neuronok esetében $71,4 \pm 15,5$ ms volt. Ebből megállapíthatjuk, hogy az átlagos késési idő a

caudalisan lévő neuronok esetében szignifikánsan hosszabb volt, mint a rostralisan tanulmányozott neuronok esetében ($p=0,003$; 20. ábra, A-C).

Összegezve az eredményeinket az A árammal rendelkező neuronokat további két alcsoportba sorolhatjuk:

1. Korai tüzelésű neuronok csoportja, ahol az első akciós potenciál megjelenése a stimulus kezdetéhez képest kevesebb, mint 250 ms belül következett be.
2. Késői tüzelésű neuronok csoportja, ahol a késés időtartama hosszabb volt, mint 250 ms (hasonlóan a bazális előagyi neuronokhoz, Unal és mtsai. 2012). Ez utóbbi csoport tehát az A-árammal rendelkező kolinerg neuronok egy kisebb alcsoportját képezik, melyek caudalisan helyezkednek el (19%, $n = 4$; 20. ábra, D - E).



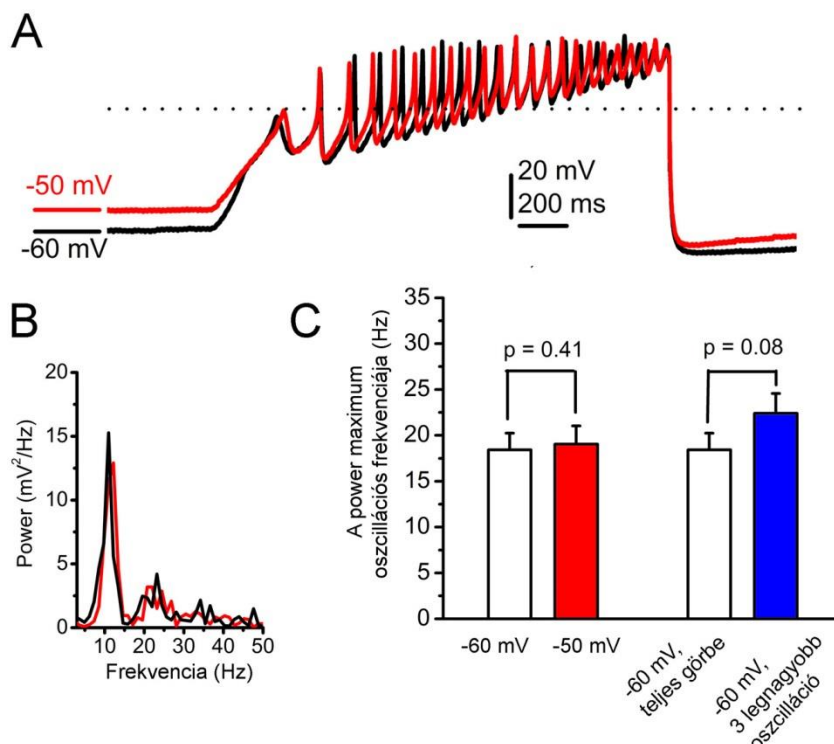
20. ábra. A tranzienis kifelé menő árammal rendelkező neuronok alcsoportjai. **A.** Korai- (felső sor) és késői tüzelésű neuronokon (alsó sor) mért feszültség- és áramgörbék. Bal oldali panelek: hiperpolarizáló (fekete) és depolarizáló (piros) előimpulzusok utáni depolarizáló feszültséglépcsőkkel mért áramok. Jobb oldali panelek: -80 mV nyugalmi membránpotenciálról kiinduló 100 pA áram injekció hatására mért feszültséggörbék. **B.** Az első akciós potenciál késés és az A-áram decay tau értékek statisztikai összefoglalása (szürke kör: adatpontok, fekete négyzet: átlag \pm SEM). **C.** Az A-áram decay tau-ja az első akciós potenciál késésének függvényében. Fekete körök: adatpontok, piros vonal: lineáris illesztés. **D.** Az eltérő késési idővel rendelkező neuronok ábrázolása térbeli ábrán. Kék kör: kevesebb mint 50 ms-os késés (nincs A-áram), sárga kör: 50 ms-250 ms közötti késés (korai tüzelésű neuron), piros kör: 250 ms-nál hosszabb késés (késői tüzelésű neuron). A késői tüzelésű neuronok caudalisan helyezkednek el, a PPN pars compacta területén. **E.** A PPN rostralis és caudalis területén elhelyezkedő neuronok akciós potenciál késéseinek összehasonlítása. Az oszlopdiaagramon ábrázolt csillagok a szignifikancia szintjét jelzik, (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0,001$.

6.1.5. Magas küszöbű membránpotenciál-oscillációk

A továbbiakban a neuronok magas küszöbű membrán oszcillációit (HTO) vizsgáltuk. Ezeket az oszcillációkat különböző feszültségfüggő kalcium- és káliumcsatornák határozzák meg (Kezunovic és mtsai. 2011). Szemben Kezunovic és mtsai. (2011) megállapításával, az oszcillációk nem minden PPN neuronra jellemzőek. A kolinerg neuronok egyik jellemző

tulajdonsága, GABAerg és glutamaterg neuronokon nem láttuk ezeket (Bordás és mtsai. 2015; nem közölt adatok). Ezt a megállapítást a jelen vizsgálataink során is megerősítettük.

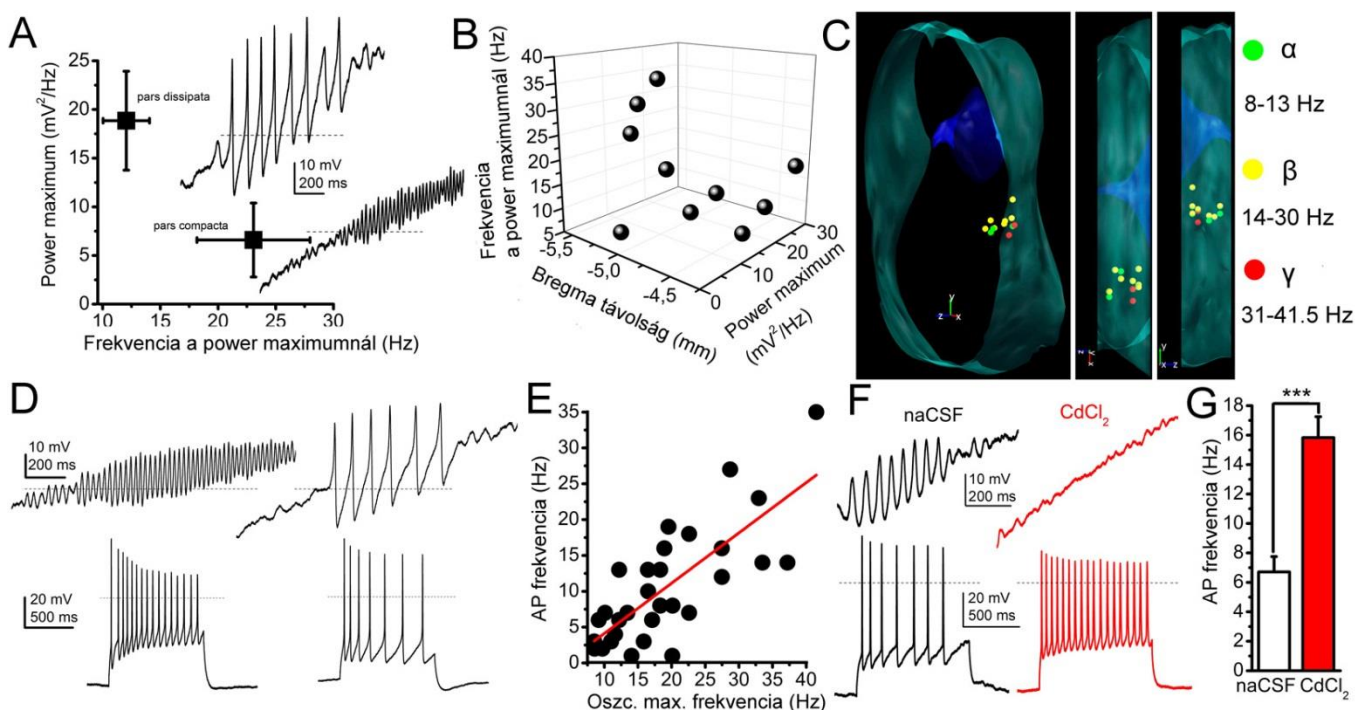
Ahhoz, hogy a magas küszöbű oszcillációk vizsgálatához adekvát protokollt válasszunk, előkísérleteink során feltártuk, hogy -60 mV-os nyugalmi membránpotenciál-értéknél ugyanolyan oszcillációs frekvenciát és power-t mérünk, mint -50 mV-nál, tehát egyik méréshez sem járul hozzá alacsony feszültség aktivált, T típusú kalciumcsatorna (n = 16). Ennek megfelelően -60 mV-os nyugalmi membránpotenciálról mértünk. Nem találtunk különbséget az oszcillációs aktivitásban, ha a gyors szinaptikus neurotranszmisszió érintetlen volt vagy blokkoltuk (n = 5), így a későbbiekben a szinaptikus neurotranszmissziót blokkoló szereket nem, csupán TTX-et alkalmaztunk az oszcillációs aktivitás mérése során. Ugyanakkor, ha egyes szerzők (Kezunovic és mtsai. 2011) módszerét követve a 3 legnagyobb oszcillációt analizáljuk és nem a teljes oszcillációs görbét, a power maximumnál numerikusan (de nem szignifikánsan; p = 0,08) nagyobb frekvenciaértékeket mérünk (n = 24). Mivel azonban a tetszés szerinti adatszelekciót nem tekinthetjük tudományos módszernek, maradtunk a teljes oszcillációs görbe analízisének (21. ábra).



21. ábra. A magas küszöbű oszcillációk előkísérletes vizsgálata. A. Reprezentatív oszcillációs feszültséggörbék TTX jelenlétébe, -60 (fekete) és -50 mV-os nyugalmi membránpotenciálról mérve (piros). **B.** A fenti oszcillációk power spektruma. **C.** A power maximum oszcillációs frekvenciájának statisztikai összehasonlítása különböző membránpotenciál

értékekről és arbitrális adatszelekcióval (kék oszlop), valamint anélkül (üres oszlop).

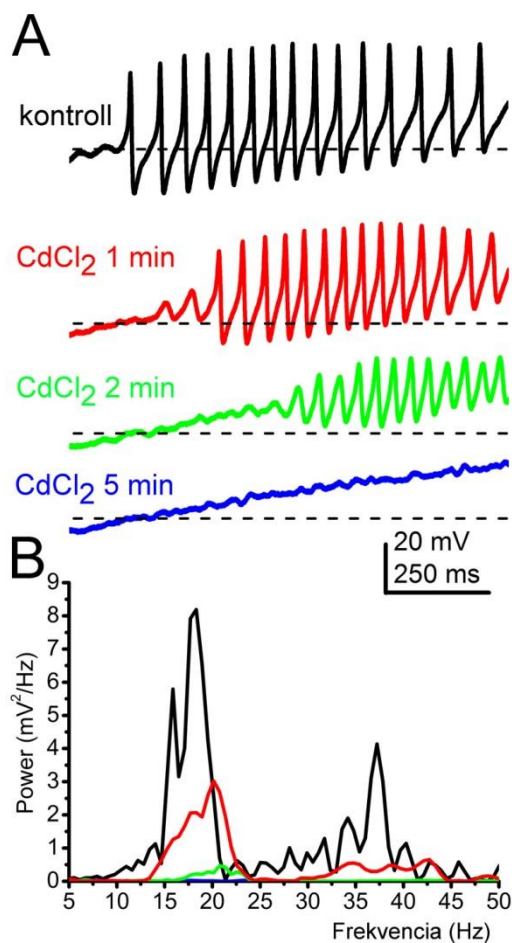
Az egyes funkcionális alcsoportokon belül jelentős különbséget nem találtunk a HTO-k frekvenciájának és amplitúdójának a tekintetében. Abban az esetben, ha az egyes neuronokon mért HTO aktivitás power maximumát és az ahhoz tartozó frekvenciaértéket korreláltattuk a neuron topográfiai helyzetével, a következő eltéréseket találtuk. A pars compactaban a neuronokat $6,59 \pm 3,8 \text{ mV}^2/\text{Hz}$ power és $23,07 \pm 4,9 \text{ Hz}$ frekvencia jellemezte, míg a pars dissipataban lévő neuronok esetében $18,85 \pm 5,08 \text{ mV}^2/\text{Hz}$ power és $12,08 \pm 2,01 \text{ Hz}$ frekvenciát mértünk ($n = 10$). Megállapíthatjuk, hogy a PPN caudalis területén lévő neuronok magasabb frekvenciával és alacsony amplitúdóval, míg a PPN rostralis részén lévő alacsony frekvenciával és nagyobb amplitúdóval oszcilláltak (22. ábra, A-C).



22. ábra. A PPN magas küszöbű oszcillációs aktivitásának vizsgálata. **A.** Az oszcillációs power maximumok a power maximumnál mért frekvencia függvényében a pars compacta és dissipata esetén. Az egyes átlagoknál egy-egy reprezentatív oszcillációs feszültséggörbe látható. **B-C.** Az oszcillációs aktivitás rostrocaudalis gradiensének bemutatása. **D.** Reprezentatív oszcillációs és akcióspotenciál-sorozat feszültséggörbék. Az egy oszlopban elhelyezkedő görbék ugyanazon neuronról kerültek rögzítésre. **E.** Az akcióspotenciál-tüzelési frekvencia a power maximumhoz tartozó oszcillációs frekvencia függvényében (fekete pontok: individuális adatok, piros egyenes: lineáris illesztés). **F.** Oszcillációs és akcióspotenciál-görbék kontroll körülmények között (fekete) és CdCl_2 jelenlétében (piros). **G.** A tüzelési frekvencia CdCl_2 hatására bekövetkező változásának statisztikai analízise. Az oszlopdiaagramokon ábrázolt csillagok a szignifikancia szintjét jelzik, (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$.

Béta frekvenciatartománynak (14-30 Hz) megfelelő HTO-kkal rendelkező kolinerg neuronokat mindenütt találtunk a PPN rostrocaudális tengelye mentén. Azok a neuronok, amelyek membránpotenciál oszcillációi theta/alfa (4-7/8-13 Hz) frekvenciatartományban voltak, rostralisán helyezkedtek el. Ezzel szemben azok a kolinerg neuronok sejttestjei, melyek alacsony gamma (30 Hz feletti) frekvenciatartományú HTO-kat mutattak, a PPN caudalis területén foglaltak helyet (22. ábra, A-C). Az oszcillációk frekvenciája és a 120 pA depolarizáló, négyzet alakú áraminjekció hatására kialakult akciós potenciálok tüzelési frekvenciája között jelentős lineáris korrelációt találtunk (meredekség: 0,7, $R^2=0,57$; $n=30$; 22. ábra, D-E).

Annak érdekében, hogy még inkább megerősítsük a tüzelési és oszcillációs frekvenciák közti összefüggést, az oszcillációkat 50 $\mu\text{mol/l}$ CdCl_2 -vel blokkoltuk. Bár az irodalomban inkább 100 $\mu\text{mol/l}$ CdCl_2 -t használnak, mi alacsonyabb koncentráció mellett döntöttünk, hogy a magban jelenlevő, asztrocitafüggő neuromodulációs folyamatokat ne zavarjuk vele. A CdCl_2 ugyanis, mint az asztrociták Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmusának gátlószere, a gliotranszmissziót képes befolyásolni (Parpura és mtsai. 2016). Ugyanakkor az alacsonyabb CdCl_2 koncentráció is képes volt az oszcillációk teljes gátlására (23. ábra).

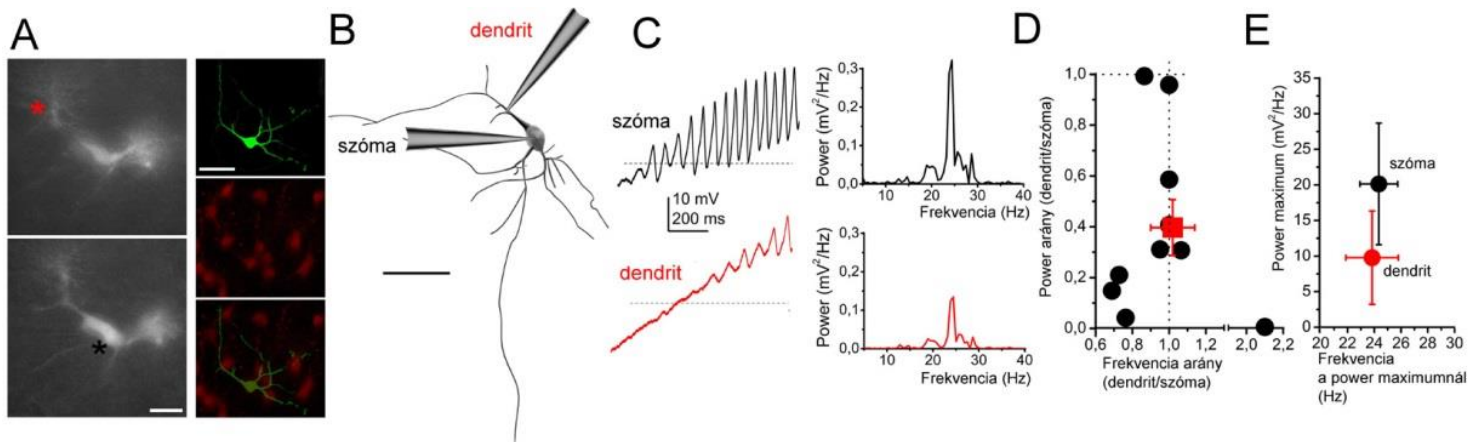


eredményeképpen, az oszcillációs aktivitás gátlásával párhuzamosan az akciós potenciálok tüzelési frekvenciája szignifikánsan emelkedett. A CdCl_2 alkalmazása előtt mért tüzelési frekvencia $6,71 \pm 1,04$ Hz volt, mely $15,38 \pm 1,42$ Hz-re növekedett ($p=0,0006$, $n=7$; 22. ábra, F-G).

23. ábra. CdCl_2 hatása a HTO aktivitásra. **A.** A CdCl_2 mintegy 5 perc alatt a HTO-k teljes gátlását okozta. **B.** A fenti mérések power spektruma, az A panel színekódjával.

A fenti kísérleteinken túl kerestük az oszcillációk eredetének helyét, melyhez egyidejű szóma-dendrit patch clamp méréseket végeztünk ($n = 10$). A vizsgálatok során az adott neuron dendritjének eredési pontja és a dendritikus mérési pont között átlagos távolság $21,44 \pm 4,96 \mu\text{m}$ volt (24. ábra, A-B). Azt találtuk, hogy a dendriten lévő oszcillációt alacsonyabb power ($9,77 \pm 6,57 \text{ mV}^2/\text{Hz}$) és majdnem azonos frekvencia jellemezte a szóma adataihoz képest ($20,13 \pm 8,55 \text{ mV}^2/\text{Hz}$ power, és $1,41 \text{ Hz}$ frekvencia). A power érték különbsége ugyan nem szignifikáns a nagy szórás miatt, de százalékban kifejezve láthatjuk, hogy a dendriteken mért oszcilláció power értéke $39,7 \pm 12\%$ -a a szómán mért oszcillációnak, a frekvencia pedig közel azonos ($102 \pm 11\%$; 24. ábra, C-E). Ez az arány megfelel az elektromos impulzusoknak a szómáról dendritre történő passzív terjedésekor tapasztalt aránynak. Ugyanis, amikor a szómán alkalmazott négyzet alakú áramimpulzus feszültség változásait mérjük mindkét területen, azt tapasztaljuk, hogy a szómán bekövetkező feszültségváltozás $42,4 \pm 4\%$ -a jelenik meg a proximális dendriten.

Összegezve a HTO-val kapcsolatos megállapításainkat elmondhatjuk, hogy a PPN két régiójában, a caudalis pars compactában és a rostralis pars dissipatában lévő neuronok eltérő frekvenciával oszcillálnak. Ezek az oszcillációk nagyobb amplitúdóval jelennek meg a szómán és feltehetően a passzív terjedésnek megfelelő dekrementtel haladnak tovább a dendritre. Továbbá, az oszcillációs aktivitás korrelál a neuronok tüzelési frekvenciájával.



24. ábra. A szomatikus és dendriten mért HTO-k összehasonlítása. **A.** (bal oldali panelek) A dendritikus (piros csillag) és szomatikus mérési pontok (fekete csillag) fluoreszcens mikroszkópos felvételen, a patch clamp mérés alatt. (jobb oldali panelek) Ugyanezen neuron biocitines jelölése (zöld) és tdTomato pozitivitása ChAT-tdTomato mintában. Kalibráció: $50 \mu\text{m}$. **B.** A szóma és a dendrit mérési pontjai, az A paneleken látható neuron rekonstruált képén. Kalibráció: $50 \mu\text{m}$. **C.** Oszcillációs aktivitás a szómáról és a dendritről. **D-E.** A szomatikus és dendritikus oszcillációk statisztikai összehasonlítása.

6.2. A PPN orexinerg neuromodulációjának asztrocitafüggő komponense

A laboratóriumunk egy korábbi munkájában kimutatta, hogy a PPN SIC-ei a kontroll SIC aktivitás függvényében mutatnak változásokat különböző neuromodulációs hatásokra, csupán a kontroll SIC aktivitástól, és nem az egyes neuromodulációs hatásoktól függő módon (7. ábra, C-D). Az eddig vizsgált neuromodulációs (muszkarinos kolinerg, szerotoninerg, kannabinoid) hatások legalább részben asztrocita-függő módon egyes neuronokon tónusos befelé irányuló, más neuronokon tónusos kifelé irányuló áramokat váltottak ki. A neuronok egy része a fenti neuromodulációs hatásokra nem válaszolt. A fenti neuromodulációs hatásokkal szemben az orexin, ismert direkt neuronális támadásponton hatva, kizárólag depolarizálja a PPN neuronokat (Kim és mtsai. 2009). Kísérleteink további részében azt vizsgáltuk, hogy a tónusos áramokra a többi vizsgált neuromodulációs hatástól eltérően ható orexin a SIC-ekre is eltérően hat-e.

6.2.1. Az orexin hatása a tónusos áramokra, EPSC-kre és az alacsony küszöbű oszcillációs aktivitásra

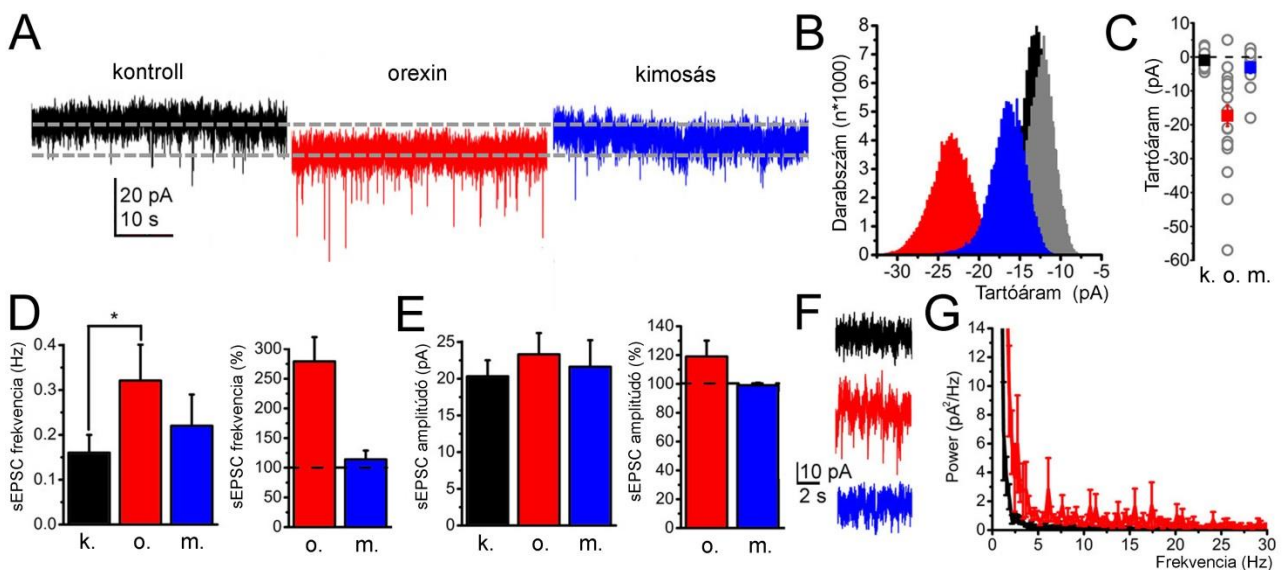
Először megismételtük az irodalmi áttekintésben korábban ismertetett kísérleteket (Kim és mtsai. 2009; Kohlmeier és mtsai. 2008; Ishibashi és mtsai. 2015). Ezt egyrészt azért tettük, hogy megtudjuk azt, hogy a mi kísérleti elrendezésünkben reprodukálhatóak-e a korábbi eredmények, másrészt azért, mert az itt vizsgált paramétereket a SIC-ekkel egyszerre mértük és így volt lehetséges később a SIC-eken és a többi paraméterben bekövetkező változások korreláltatása.

Kísérleteinkbe 21 PPN neuront vontunk be, amelyek közül 8 db kolinerg, 5 db nem-kolinerg és 8 db nem azonosított volt. A három neuronpopuláció között nem láttunk különbséget az EPSC-ken, tónusos áramokon és SIC-eken látott hatásokban. Valamennyi orexines kísérleünket nominálisan magnéziummentes oldatban végeztük annak érdekében, hogy a SIC-ek spontán előfordulását valószínűbbé tegyük (Kovács és Pál, 2017). 200 nmol/l orexin-A alkalmazásakor $-17,32 \pm 3,11$ pA amplitúdójú tónusos befelé irányuló áramot mértünk, ami szignifikánsan különbözött a tartóáram kontroll körülmények között mért, $-0,98 \pm 3,11$ pA amplitúdójú ingadozásától ($p = 0,0001$; 25. ábra, A-C panel). A korábbi publikációnkban a tónusos áram meglétének vagy hiányának az általunk megállapított határa 3,5 pA volt (Kovács és Pál, 2017). Ennek a kritériumnak alapján egy esetben kismértékű kifelé irányuló áramot (+5 pA) találtunk, egy további esetben nem volt tónusos áram (-3 pA), de a

további 19 esetben befelé irányuló tónusos áramot láttunk. Az esetek nagy részében ez a hatás kimoshatónak bizonyult, a kontrollhoz viszonyítva $-3,12 \pm 1,67$ pA tónusos áram maradt vissza.

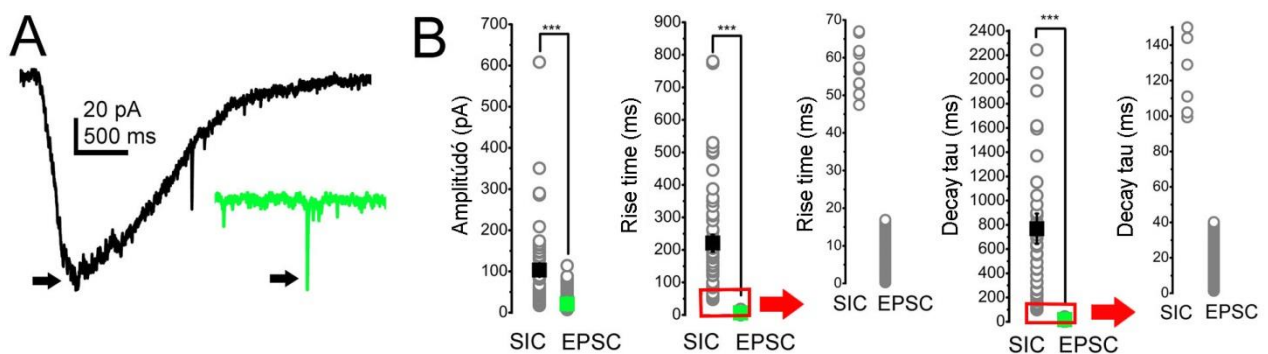
A tónusos áram kialakulásával párhuzamosan a sEPSC frekvencia szignifikánsan megnövekedett. A sEPSC amplitúdó nem növekedett szignifikánsan, de növekedési tendenciát mutatott (25. ábra, D-E). A frekvencia a kontroll $279 \pm 41\%$ -ára emelkedett orexin alkalmazása során ($0,16 \pm 0,04$ Hz-ről $0,32 \pm 0,08$ Hz-re, $p = 0,04$), a kimosás során a frekvencia $0,21 \pm 0,07$ Hz-re (a kontroll $114 \pm 15\%$ -ára) tért vissza. Az amplitúdó a kontroll $119 \pm 12\%$ -ára nőtt orexin jelenlétében ($20,33 \pm 2,18$ pA-ról $23,32 \pm 2,9$ pA-re), a kimosás során $21,63 \pm 3,62$ pA-re (a kontroll $99,9 \pm 1,8$ %-ára) tért vissza. Az orexin zajszerűen jelentkező, alacsony küszöbű oszcillációkat is aktivált. A kontroll és az orexin hatása során mért görbék power spektrumának egyetlen exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel történő illesztései szignifikánsan különböztek egymástól ($p = 0,0001$; 25. ábra, F-G).

25. ábra. Az orexin hatása a PPN neuronok tartóáramára és szinaptikus eseményeire. A. A



tartóáram változásai (fekete: kontroll, piros: orexin, kék: kimosás). **B.** Az A panelen látható görbék 1 perces szakaszainak hisztogramjai (fekete és szürke: a kontroll mérés két külön szakasza, piros: orexin, kék: kimosás). **C.** A tartóáram változásai. k.: kontroll; o.: orexin; m.: kimosás; szürke körök: individuális adatok; négyzetek: átlag \pm SEM. **D.** A sEPSC frekvencia változásainak oszlop diagrammjai numerikus (jobb) és a kontrollra normalizált (bal) adatok esetén. **E.** A sEPSC amplitúdó változásainak oszlop diagrammjai numerikus (jobb) és a kontrollra normalizált (bal) adatok esetén. **F.** 10 s hosszúságú kontroll (fekete), orexin hatása alatti (piros) és kimosást követő (kék) gapfree mérése. **G.** A gapfree mérések power spektrumainak átlagai \pm SEM (fekete: kontroll, piros: orexin). Az oszlopdiagramokon ábrázolt csillagok a szignifikancia szintjét jelzik, (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$.

A PPN SIC-einek sEPSC-ktől történő elkülönítését a laboratórium korábbi munkájában már elvégezte (Kovács és Pál, 2017). A korábbi eredményeket megerősítettük azzal, hogy az ebbe a tanulmányba bevolt SIC-ek és sEPSC-k paramétereit is összevetettük. SIC-ek a vizsgált 21 neuron közül 7 neuronon voltak kontroll körülmények között mérhetőek $0,33 \pm 0,08$ /perc frekvenciával. Összesen 58 SIC-et regisztráltunk kontroll körülmények között. A SIC-ek felszállásának időtartama ("rise time") $216,65 \pm 30,2$ ms volt (33,5 és 774 ms közötti tartományban), míg a sEPSC-k esetén $5,9 \pm 0,07$ ms volt (0,3 és 16,9 ms közötti tartományban). Az értékek nemcsak szignifikáns különbséget mutattak ($p < 0.0001$), hanem élesen elváló tartományokat formáltak. A leszállás időállandója ("decay tau") is hasonló különbségeket mutatott: a SIC-ek esetén ez az érték 722 ± 97 ms volt (70 – 2244 ms között), a sEPSC-kenél $16,2 \pm 0,2$ ms (1,4 és 40,7 ms közötti; $p < 0.0001$). A kétféle esemény amplitúdója ugyan hasonlóan szignifikáns különbséget mutatott ($108,36 \pm 17,63$ pA, 14,5 - 608,2 pA a SIC-ek és $22,94 \pm 0,19$ pA, 7,12 – 114,2 pA között a sEPSC-k esetén; $p < 0.0001$), de itt már található volt valamekkora numerikus átfedés az adatok között. Ahogy korábban is megfigyeltük az események egymással nem átfedő kinetikai sajátosságai jó alapot szolgáltatnak a kétféle esemény elkülönítésére (26. ábra)



26. ábra. A PPN sEPSC-inek és SIC-einek összehasonlítása. **A.** Egy reprezentatív SIC (fekete) és sEPSC (zöld). **B.** Az EPSC-k és SIC-ek paramétereinek statisztikai összehasonlítása. A piros négyzetek jelölt adattartományok a nyíllal jelölt koordinátarendszerben kerültek kinagyításra. Szürke körök: individuális adatok, négyzetek: átlag \pm SEM.

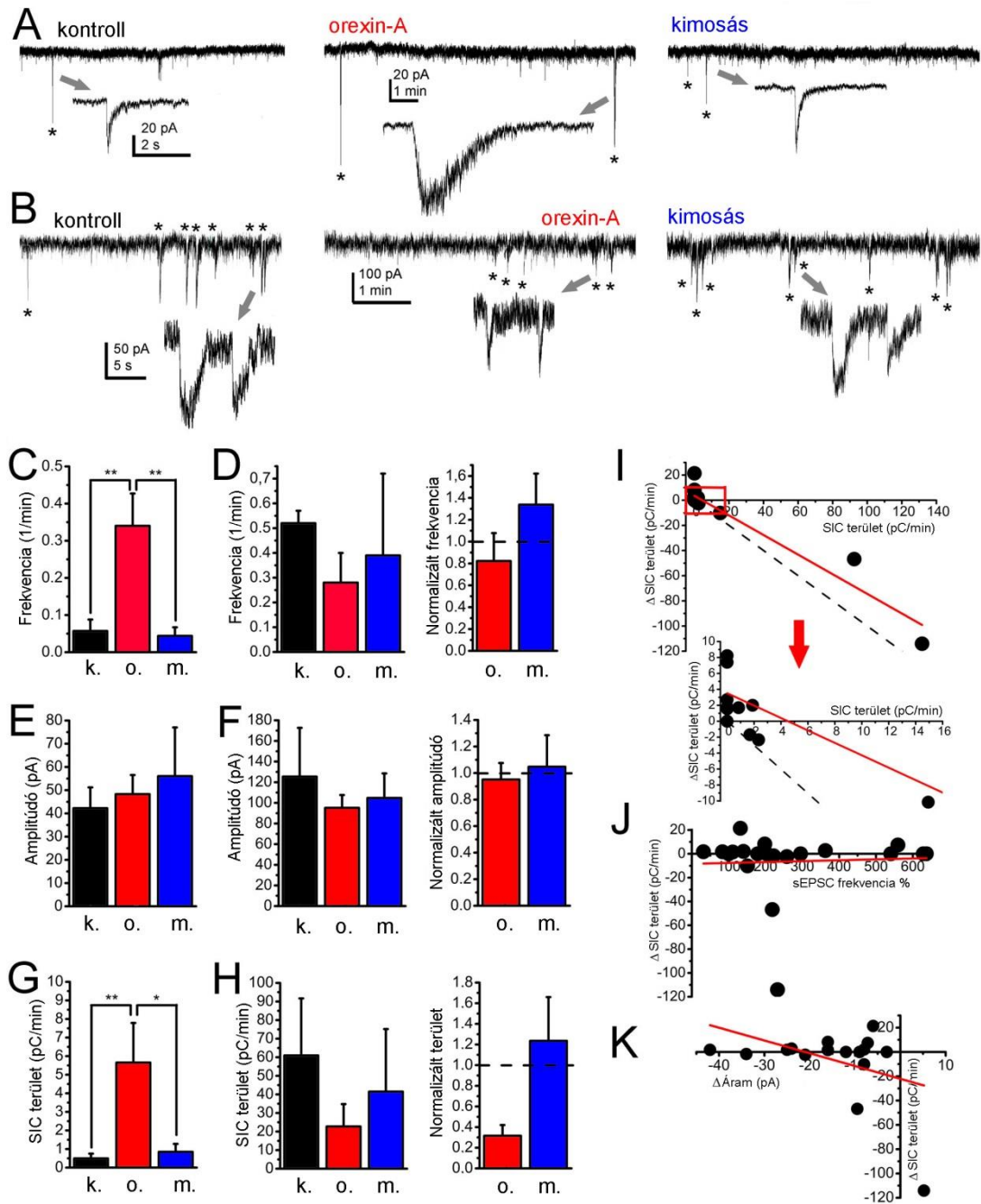
8 neuron esetében sem kontroll esetben, sem orexin alkalmazásakor nem jelentek meg SIC-ek. A további 13 esetben az orexin a SIC-ek megjelenését megváltoztatta (27. ábra, A-B).

9 alkalommal a SIC aktivitás alacsony volt kontroll körülmények között (a töltésmozgás 2 pC/perc alatti volt). Ezekben az esetekben az orexin megnövelte a SIC-ek frekvenciáját ($0,06 \pm 0,03$ /percről $0,34 \pm 0,08$ /percre, $p = 0,003$). Kimosáskor a frekvencia a $0,04 \pm 0,02$ /perces értékre tért vissza (az orexines hatással összehasonlítva, $p = 0,001$). A töltésmozgás az orexin hatására $0,49 \pm 0,26$ -ról $5,6 \pm 2,1$ pC/percre nőtt ($p = 0,01$), míg kimosáskor $0,85 \pm 0,42$ pC/percre tért vissza ($p = 0,047$). Az amplitúdó és a SIC-ek kinetikai paraméterei nem változtak (27. ábra, C, E, G).

Abban a 4 esetben, mikor a SIC aktivitás már kontrollban magas volt (a töltésmozgás 2 pC/perc feletti volt), az orexin a SIC frekvencia és töltésmozgás tendenciaszerű csökkenését okozta. A frekvencia $0,52 \pm 0,05$ /percről $0,28 \pm 0,12$ /percre csökkent (a kontroll $52 \pm 12\%$ -ára), míg a töltésmozgás $60,95 \pm 30,6$ pC/percről $22,7 \pm 12,4$ pC/percre (a kontroll $32 \pm 10\%$ -ára; 27. ábra, D, F, H).

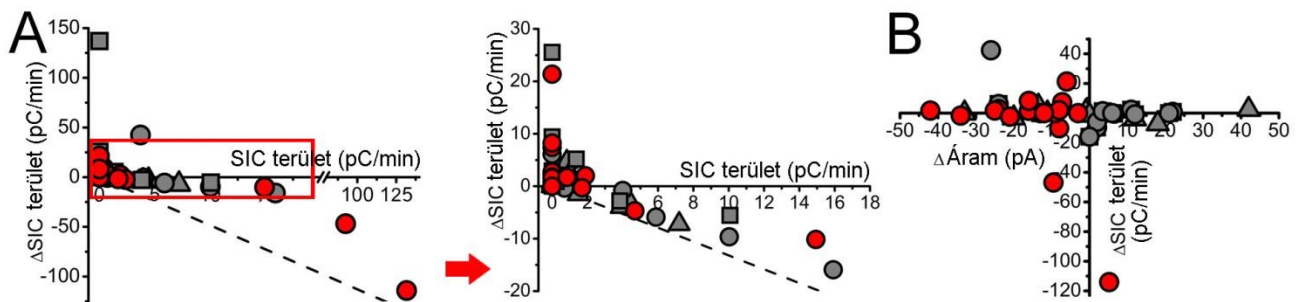
Ha a SIC-ek általi töltésmozgás változásait a kontroll SIC töltésmozgás függvényében ábrázoltuk, a pontok illesztése egyértelmű lineáris összefüggést tárt fel ($R^2 = 0,92$; 27. ábra, I panel). Ha a SIC-ek általi töltésmozgás változásait a sEPSC-k változásának vagy a kialakuló tónusos áramnak a függvényében ábrázoltuk, semmilyen vagy csak gyenge lineáris korrelációt tapasztaltunk ($R^2 = -0,05$ és $0,11$; 27. ábra, J, K).

Elvégeztük az orexin SIC-ekre kifejtett hatásának összehasonlítását a SIC-eken érvényesülő más neuromodulációs hatások (muszkarinos kolinerg, szerotoninerg, kannabinoidek) SIC-ekre gyakorolt, korábban már közölt hatásaival (Kovács és Pál, 2017). Azt figyeltük meg, hogy az orexin által a SIC-ekre kifejtett hatás nem mutatott különbséget más neuromodulációs hatásokkal (28. ábra, A). Éles kontrasztként azonban azt láttuk, hogy míg a többi neuromodulációs hatás befelé és kifelé irányuló tónusos áramokat is kelthet, addig az orexinnél a befelé irányuló tónusos áramok erős dominanciáját figyelhettük meg (28. ábra, B).



27. ábra. Az orexin hatása a PPN neuronok SIC-eire. **A-B.** Reprezentatív SIC mérések. **A.** Egy reprezentatív mérés, ahol az orexin a SIC-ek töltésmozgását megnövelte. **B.** Másik reprezentatív mérés, ahol az orexin a SIC-ek frekvenciáját és töltésmozgását csökkentette. Csillagok: SIC-ek, nyíllal jelölt görbék: a fenti görbék kinagyított részletei. **C-H.** A SIC-ek paramétereiben orexin hatására bekövetkezett változások statisztikai adatai (k.: kontroll; o.: orexin; m.: kimosás) **C, E, G.** Azon adatok statisztikai összesítése, ahol az orexin a SIC-ek kialakulását serkentette. **D, F, H.** Azon adatok statisztikai összesítése, ahol az orexin a SIC-ek kialakulását gátolta. **I.** A SIC-ek területének (töltésmozgásának) változásai a SIC kontroll körülmények közötti töltésmozgásának függvényében. Fekete pontok: individuális adatok,

piros egyenes: lineáris illesztés; szaggatott egyenes: $x = -y$ függvény (az adatpontok ide kell hogy essenek teljes gátlás esetén). A piros négyzeten jelölt adattartományok a nyíllal jelölt koordinátarendszerben kerültek kinagyításra. **J.** A SIC-ek területének (töltésmozgásának) változásai a sEPSC-k frekvenciaváltozásának függvényében. **K.** A SIC-ek területének (töltésmozgásának) változásai a tartóáram változásának függvényében.



28. ábra. Az orexinerg és más neuromodulációs hatások összehasonlítása. **A.** A SIC-ek területének (töltésmozgásának) változásai a SIC kontroll körülmények közötti töltésmozgásának függvényében. Piros pont: individuális adatok az orexines kísérletből, szürke négyzet: individuális adatok karbakollal, szürke háromszög: individuális adatok szerotoninnal, szürke kör: individuális adatok WIN55, 212-2-vel (a szürke szimbólumok Kovács és Pál, 2017 adatai), szaggatott egyenes: $x = -y$ függvény (az adatpontok ide kell hogy essenek teljes gátlás esetén). A piros négyzeten jelölt adattartományok a nyíllal jelölt koordinátarendszerben kerültek kinagyításra. **B.** A SIC-ek területének (töltésmozgásának) változásai a tartóáram változásának függvényében. Jelmagyarázatért ld. az A panelt.

7. MEGBESZÉLÉS

A jelen dolgozatban választ kerestünk arra a kérdésre, hogy a PPN kolinerg neuronok hagyományos *in vitro* elektrofiziológiai csoportosítása megállja-e a helyét a transzgen technikákkal azonosított kolinerg neuronok esetén is. Arra a kérdésre is választ kerestünk, hogy újabb csoportosítási lehetőségeket, esetleg a funkcionális tulajdonságok rostrocaudalis gradiensét fel lehet-e tární. A másik fontos kérdés, amire választ kerestünk, az az volt, hogy az orexinerg neuromodulációnak van-e asztrocita függő komponense. Ha igen, azonos-e ez a komponens a más neuromodulációs hatások során látottakkal.

Röviden összefoglalva, azt állapítottuk meg, hogy a PPN neuronok hagyományos elektrofiziológiai csoportosítása megállja a helyét transzgen technikák alkalmazása esetén is. Az A-árammal rendelkező kolinerg neuronok között két további csoportot, a korai és késői tüzelésű neuronok kategóriáit mutattuk be. Feltártuk, hogy korai és késői tüzelésű neuronok, valamint az alacsony és magas frekvenciájú membránpotenciál-oszcillációt mutató neuronok a mag rostrocaudalis tengelye mentén ekülönülnek.

Kimutattuk továbbá, hogy az orexinerg neuromoduláció asztrocitákon keresztül érvényesülő része a SIC-ekre kifejtett hatását nézve megegyezik a többi neuromodulációs hatásával. A SIC-ekre kifejtett neuromodulációs hatás feltehetően egy aspecifikus, közös komponense lehet a mag neuronjainak aktivitását megváltoztató hatásoknak.

7.1. A PPN kolinerg neuronok funkcionális csoportosítása

Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a ChAT-tdTomato egérmodell alkalmas a kolinerg neuronok funkcionális tulajdonságainak vizsgálatára, és használatával megerősíthető az eddig leírt funkcionális csoportok megléte. Megerősítettük a HTO-k jelenlétét a kolinerg neuronokon és bebizonyítottuk, hogy az akciós potenciál tüzelési frekvenciáját meghatározzák.

A korábbi adatok megerősítése mellett újdonságként bemutattuk, hogy a kolinerg neuronok különböző funkcionális csoportjai a PPN caudális és rostralis területén eltérő arányban találhatóak. Az LTS-ek a PPN kolinerg neuronokon ritkán váltanak ki akciós potenciált és elsősorban a PPN rostralis területén lévő kolinerg neuronok tulajdonsága. Azokat a neuronokat, amelyek A árammal rendelkeznek (II. és III. típus), további alcsoportokra tudtuk

osztani. Így különböztettünk meg korai és késői tüzelésű alcsoportokat, melyek közül a késői tüzelésű csoport inkább a PPN caudalis részén volt megtalálható.

A magas frekvenciával és alacsonyabb powerrel rendelkező HTO-k a PPN caudalis részén voltak, míg a magas powerű, alacsonyabb frekvenciájú HTO-k inkább a rostralis területen voltak láthatóak. Emellett megállapítottuk, hogy a HTO-k magasabb amplitúdót mutattak a szómán, mint a proximális dendriten.

7.1.1. A kolinerg neuronok neurokémiai azonosítása

A PPN kolinerg neuronjainak funkcionális tulajdonságairól szóló tanulmányok nagy része változatos módszereket használt a kolinerg neuronok azonosítására. A legtöbb *in vivo* és szelet-elektrofiziológiai tanulmány az esetek nagy részében *post hoc* neuronális azonosítást és immunjelölést használt. *In vivo* (Steriade és mtsai. 1990; Datta és Siwek, 1997) és szelet-elektrofiziológiai tanulmányok (Kamondi és mtsai. 1992) is alkalmazták a NADPH diaphoráz vagy bNOS jelölést a kolinerg neuronok azonosítására (Ye és mtsai. 2010). A bNOS jelölés a régióban levő kolinerg neuronoknak specifikus jelölése, a ChAT és bNOS jelölés között majdnem teljes átfedés van (Veleanu és mtsai. 2016; Sugaya és McKinney, 1994). A kolinerg neuronok azonosításának a legelterjedtebb módszere a ChAT immunhisztokémia: számos szelet-elektrofiziológiai tanulmány (Mena-Segovia és mtsai. 2009; Luquin és mtsai. 2018; Takakusaki és mtsai. 1996) és *in vivo* munkák is alkalmazzák (Gut és Winn, 2015; Mena-Segovia és mtsai. 2008b). Alternatív módszerként vezikuláris acetilkolin transporter (VACht) immunjelölés (Boucetta és mtsai. 2014) vagy egy sejten végzett („single cell”) RT-PCR-t is használnak a ChAT láthatóvá tételére (Saitoh és mtsai. 2003). Miután a transzgen technikák elérhetővé váltak patkányok és egerek vizsgálataihoz, számos *in vivo* tanulmányban használnak kolinerg neuronok azonosítására ChAT promoter alatt cre-t kifejező állatokat. Miután a kísérleti állatot cre-dependens vírusokkal injektálták, azok a ChR2 mellett sárga fluoreszcens proteint („yellow fluorescent protein”, YFP) vagy mCherry fehérjét fejeztek ki, más tanulmányokban a hM3 receptorral együtt kifejeződő mCherry-vel tették a kolinerg neuronokat láthatóvá (Kroeger és mtsai. 2017).

Bár volt néhány tanulmány, ahol genetikailag azonosított kolinerg neuronokon történtek mérések -pl. amelyek az M áram jelenlétét mutatták ki (Bordás és mtsai. 2015), a tüzelési frekvencia adaptáció különbségeit (Petzold és mtsai. 2015), vagy neuromodulációs hatásokat

(Kőszeghy és mtsai. 2015; Ishibashi és mtsai. 2015) demonstráltak-, a membrántulajdonságok szisztematikus analízise genetikailag azonosított PPN kolinerg neuronokon eddig még nem történt meg.

Az irodalmi adatokkal összhangban (Ishibashi és mtsai. 2015) mi is bemutattuk, hogy a ChAT–tdTomato egér modell eredményesen használható neuronok funkcionális paramétereinek vizsgálatához. Mindössze elhanyagolható számú tdTomato-pozitív neuron bizonyult ChAT-negatív neuronnak az immunhisztokémiai vizsgálat során. Az összes jelölt neuron 11%-a mutatott ChAT pozitivitást immunhisztokémiával, melyek ugyanakkor nem expresszáltak tdTomato-t. Ez az eredmény felveti azt, hogy a kolinerg neuronok egyik eltérő alcsoportját nem vettük figyelembe, amikor csupán genetikailag azonosított kolinerg neuronokat vizsgáltuk. Ezt a lehetőséget azonban szerencsére nem támogatja az egyetlen tanulmány, mely mindkét jelölési módot alkalmazta a kolinerg neuronok azonosítására. Itt ugyanis a tdTomato expresszió és az immunhisztokémiai azonosítás segítségével azonosított neuronok azonos arányban rendelkeztek M-árammal (Bordás és mtsai. 2015). Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a kolinerg neuronok általunk is használt genetikai azonosítása megbízható technika a kolinerg neuronok neurokémiai azonosításához.

7.1.2. „Klasszikus” funkcionális alcsoportok a PPN kolinerg neuronjain belül

A PPN-ben lévő neuronokat hagyományosan 3 nagy csoportra osztották a membránsajátságaik alapján. Az I. típusú neuronok kalcium konduktanciák által okozott LTS-sel rendelkeznek, mely lehetővé teszi a nagy frekvenciájú és rövid időtartamú, úgynevezett burst tüzelést számukra. A II. típusú neuronok A árammal rendelkeznek, a III. típusú neuronra pedig mindkét tulajdonság jellemző vagy egyik sem (Takakusaki és mtsai. 1996; Kamondi és mtsai. 1992; Leonard és Llinas, 1988; Leonard és Llinas, 1994). Az egyik tulajdonsággal sem rendelkező típust IV. típusnak is írják az irodalomban esetenként (Ye és mtsai. 2010). Ez utóbbi típus, mely egyik tulajdonsággal sem rendelkezik, jelen vizsgálatainkban IIIK. típusként szerepel, ahol a „K” jelzőt Kang és Kitai szerzők után kapták. Ők voltak az a szerzőpáros, aki először leírta ezt a neurontípust (Kang és Kitai, 1990). A továbbiakban a félreértéseket elkerülendő az irodalmi adatokban előforduló nem egységes jelölést is lefordítottuk a saját csoportosítási kódjainkra, hogy összehasonlíthatók legyenek a mi adataink számos más szerzőtől származó adatokkal (ld. még 2. táblázat).

A legtöbb irodalmi adat szerint a II. típusú neuronok fordulnak elő leggyakrabban a PPN-en belül (Takakusaki és mtsai. 1996; Leonard és Llinas, 1994; Ye és mtsai. 2010), az esetek 52,2-75%-ában. Ezzel szemben Kang és Kitai (1990) azt találta, hogy mindössze a neuronok 1/3-a sorolható ebbe a kategóriába. A neuronok kolinerg és nem kolinerg természetét is vizsgálták a tanulmányokban, és azt találták, hogy az összes II. típusú neuron kolinerg volt (Kang és Kitai, 1990), az I. típusú neuronok kizárólag nem-kolinergek voltak, a nem-kolinerg neuronok 82%-uk II. típusú és 18%-uk III. típusú volt (Takakusaki és mtsai. 1996). Más tanulmányban a vizsgált neuronok 3% bizonyult I. típusúnak, 75% II. típusú volt, míg 22% III. típusba volt sorolható (Leonard és Llinas, 1994). Érdemes megjegyezni, hogy ezeket a vizsgálatokat genetikailag nem módosított patkányokon végezték. Nagyjából egybevágóan az irodalmi adatokkal, a transzgén egéren végzett vizsgálataink során is azt találtuk, hogy a vizsgált neuronok csak kis része, 12%-a tartozott az I. csoportba és a legtöbb (48%) a II típusú neuronból volt. Az eddigi tanulmányok nem vizsgálták azt, hogy az egyes funkcionális csoportok elhelyezkedése között van-e rostrocaudalis különbség. Adatainkat elemezve elsőként mi írtuk le, hogy a II. típusú neuronok nagyobb arányban voltak jelen a PPN caudalis területén, és a rostralis elhelyezkedő neuronok 1/3-a tartozott ide. Ez az eredmény azonban ellentétes egyes szerzők megállapításával (Takakusaki és mtsai. 1996) akik azt találták, miszerint a II. típusú neuronok inkább rostralis irányba lokalizálódnak. Ennek az ellentmondásnak feltételezhetően több magyarázata lehet. Egyrészt nem-kolinerg neuronok is részt vettek Takakusaki és mtsai. (1996) vizsgálatában, másrészt interspecies különbség is előfordulhat, mivel Takakusaki patkányon, mi pedig egereken dolgoztunk.

Tanulmányunkban az LTS-ek előfordulása szintén egy jól tettenérhető rostrocaudalis grádiens mutat, ugyanis ezzel a tulajdonsággal főleg a rostralis elhelyezkedő neuronok rendelkeznek. Fontos megjegyezni, hogy a LTS jelenléte nem jelenti feltétlenül azt, hogy a neuronok burst típusú tüzelést mutatnak: a neuronok kevesebb, mint 10%-a tüzelt egyetlen akciós potenciált az LTS csúcsán, de 2 vagy több akcióspotenciál sosem jelent meg az LTS tetején. Ezzel szemben a PPN glutamaterg neuronjainak egy nagyobb hányada volt képes burst tüzelésre (nem publikált adat). Azt is megállapítottuk, hogy a PPN Vglut2- és ChAT pozitív kis alpopulációja nem homogén és nem azonos más egyéb funkcionális alcsoportokkal.

Az irodalmi adatok alapján a különböző csoportokba tartozó neuronok morfológiailag lényegesen eltérnek a szóma területében és a dendritszámban (Takakusaki és mtsai. 1996; Kang és Kitai, 1990). Mi egyetlen esetben találtunk potenciális jelentőséggel bíró morfológiai különbséget funkcionális alcsoportok között. Az LTS-sel rendelkező neuronok ugyanis

jellemzően bipoláris dendritfával rendelkeztek, míg az LTS nélküliek inkább multipolárisak voltak. Ezen túl semmilyen más jelentőségteljes korrelációt nem találtunk az egyes neuronok típusa és a neuronokat jellemző funkcionális paraméterek vagy morfometriai adatok között. Olyan összefüggéseket találtunk ugyanis, hogy a nagy szóma átmérő a kis bemenő ellenállással függ össze, továbbá a hosszú dendritekkel rendelkező neuronokon több dendrit elágazódási pont van. Ezek azonban részben a tankönyvi adatok megerősítése, másrészt könnyen belátható evidenciák.

A funkcionális csoportok felállítására szolgáló paraméterek (LTS és A-áram) mellett az irodalom egyetlen más funkcionális különbséget írt le: thalamusba projiciáló II. típusú neuronokat a karbakol gátolta vagy a gátlás és serkentés kombinációjából álló bifázisos választ látták rajtuk, míg a III. típusú neuronokat a karbakol serkentette (Ye és mtsai. 2010). A különböző funkcionális neurontípusok esetében a nyugalmi membrán potenciálban nem volt szignifikáns különbség (Simon és mtsai. 2010). Mi is számos más funkcionális tulajdonságot vizsgáltunk az egyes funkcionális neurontípusok esetében, és azt találtuk, hogy a bemenő ellenállás, tüzelési frekvencia adaptáció és a HTO tekintetében nincs szignifikáns különbség a különböző csoportok között. Az egyetlen különbség mindössze annyi volt, hogy a III. típusú neuronok alacsonyabb maximális tüzelési frekvenciát mutattak depolarizáció hatására.

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy az irodalomban eddig használatos eredeti csoportosítás még mindig használható a PPN neuronok funkcionális membránsajátságainak leírására. Az LTS jelenlétének rostrocaudális különbségei, valamint a III. típusú neuronok alacsony tüzelési frekvenciája együttesen arra utalhatnak, hogy a rostrocaudalis tengely mentén a kolinerg neuronok funkciója eltérő lehet (ld. lentebb).

7.1.3. Korai és késői tüzlésű kolinerg neuronok a PPN-ben

A II. és III. típusú neuronok egy jellemzője, hogy A-árammal rendelkeznek. Ez egy tranziens, feszültségkapuzott káliumáram, melyről azt tudjuk, hogy az akciós potenciál késését okozza a depolarizáló stimulus kezdetéhez képest (Coetzee és mtsai. 1999; Kanold és Manis, 1999; Unal és mtsai. 2012). Az A-áram legkönnyebben egy olyan depolarizáló impulzussal mérhető, melyet megelőz egy hiperpolarizáció, ami elmozdítja az áram inaktivációját (Coetzee és mtsai. 1999; Birnbaum és mtsai. 2004). Ha az A-árammal rendelkező neuronokat hiperpolarizáljuk, a stimulus kezdetéhez képest az akciós potenciál megjelenése késni fog. Az

irodalmi adatok alapján az A-áram késői ideje 50 és 500 ms között változik. A lassabb kinetikával rendelkező hasonló áramokat „lassú A-áramnak” nevezzük, vagy időnként D-áramnak is (Miller és mtsai. 2008; Unal és mtsai. 2012).

Feltételezhető, hogy az akciós potenciál késése korrelál az A-áram leszálló szárának decay tau-jával; kivéve, ha más konduktanciák is aktiválódnak vele együtt és megváltoztatják a membránpotenciálra gyakorolt hatását. Érdekes módon, bár a bazális előagyi kolinerg neuronok korai és késői tüzelésű neuronokra oszlanak, az A-áram decay tau-ja nem különbözik a két csoportban (Unal és mtsai. 2012; Bardóczi és mtsai. 2017). A bazális előagyi csoportosításhoz hasonlóan a mi eredményeink alapján javasolható, hogy az A árammal rendelkező PPN kolinerg neuronokat is korai és késői tüzelésű neuronokra osszuk. Szemben a bazális előagggyal, a PPN-ben egy teljesen egyértelmű korrelációt figyelhetünk meg az A-áram kinetikája és az akciós potenciál késése között. Újabb rostrocaudalis különbségként, a késői tüzelésű neuronok egy kisebb csoportja a PPN caudalis részén foglalt helyet.

Az A-áramnak a fiziológias akcióspotenciál-tüzelésben betöltött szerepe mellett feltételezhető a hozzájárulása különböző kórélettani folyamatokhoz is. Azt találták, hogy kísérletesen előidézett gyulladáshoz vezető körülmények között a cardiomyocyták A-áramának amplitúdója csökkent (Monnerat-Cahli és mtsai. 2014). Ennek alapján feltételezhetjük, hogy neuroinflammatorikus folyamatok a PPN kolinerg neuronjainak tüzelési mintázatát is képesek befolyásolni azáltal, hogy csökkentik az A-áram amplitúdóját és az akciós potenciál késést, hozzájárulva az alvás-ébrenlét ciklusok megváltozásához.

7.1.4. Magas küszöbű membránpotenciál oszcillációk

Intrinsic membránpotenciál-oszcillációk az agy számos területén megfigyelhetők. Ilyenek az entorhinális kéreg és a neocortex (Llinas és mtsai. 1991; Alonso és Llinas, 1989), az amygdala (Pape és Driesang, 1998), a thalamus (Garcia-Rill és mtsai. 2013), és a parabrachialis areában (Leonard és Llinas, 1990). Ilyen oszcillációk a PPN kolinerg neuronjain is megfigyelhetők (Takakusaki és mtsai. 1997; Bordás és mtsai. 2015). Bizonyos oszcillációs aktivitások TTX érzékenyek (Simon és mtsai. 2010; saját nem publikált eredmények), míg mások TTX rezisztensek (Kezunovic és mtsai. 2011; Bordás és mtsai. 2015). TTX-re nem érzékeny magasküszöbű membrán oszcillációk mérése nagymértékben depolarizált membrán potenciál (-30 ± 15 mV) mellett lehetséges. Ezekért az oszcillációkért P/Q- és N típusú kalcium

csatornák (Kezunovic és mtsai. 2011), valamint dendrotoxin érzékeny és M típusú kálium csatornák felelősek.

Az oszcillációk frekvenciája 4-16 Hz (Takakusaki és mtsai. 1997) és 4-80 Hz (Kezunovic és mtsai. 2011) között változik a theta és beta-gamma tartományok között. A szerzők által közölt eltérő frekvenciatartomány oka esetlegesen a Kezunovic és mtsai. (2011) által végzett arbitrális adatszelekció lehet (l. 22. ábra, C). Magas amplitúdójú alacsony frekvenciájú oszcillációkat mutató neuronok a PPN rostralis területén találhatóak, míg az alacsony amplitúdójú magas frekvenciájú oszcillációkkal bíró neuronok pedig inkább caudalisan helyezkedtek el a PPN-en belül (Takakusaki és mtsai. 1997). Vizsgálataink során egyértelműen megállapítottuk, hogy a PPN kolinerg neuronjainak jellemző tulajdonsága a magas küszöbű oszcilláció (HTO), függetlenül a klasszikus funkcionális alcsoportoktól vagy a morfológiai jellemzőktől. Megerősítve a Takakusaki és munkacsoportja által leírtakat (Takakusaki és mtsai. 1997) az alacsony frekvenciájú és magas amplitúdójú oszcillációkat a genetikailag azonosított kolinerg neuronok esetében a PPN rostralis területén találtunk, míg a caudalisan lévő kolinerg neuronokra az alacsony amplitúdójú és magas frekvenciájú oszcillációk voltak jellemzőek. Nem teljesen megnyugtatóan megbízható képalkotó kísérletek interpretációjaként egyes szerzők feltételezték, hogy ezek az oszcillációk a distalis dendriten keletkeznek (Luster és mtsai. 2015; Kezunovic és mtsai. 2013). Hogy teszteljük ezt a hipotézist, párhuzamos méréseket végeztünk a szómán és a dendriten. Technikai limitációk miatt a dendritek proximális területén végeztük a méréseket, kb. 20 μm -re annak eredésétől. Azt találtuk, hogy a szómán mért oszcillációs aktivitás a dendriten alacsonyabb amplitúdóval, de azonos frekvenciával és időben jelenik meg. Ebből adódóan azt feltételeztük, hogy a HTO kialakulásának helye a szoma, és az oszcilláció passzívan terjed a dendrit felé. Mivel a distalis dendriteken közvetlen méréseket nem végeztünk, nem tudjuk teljesen kizárni, hogy a distalis dendrit rendelkezik önálló oszcillációkkal.

Az oszcillációk fiziológiai jelentősége is fontos kérdés. Egyesek úgy gondolják, hogy a membránpotenciál-oszcillációk a PPN-ben a mag gamma oszcillációjáért felelősek és képesek meghatározni a cortex gamma oszcillációit (Kezunovic és mtsai. 2011). Ezt a feltételezést alátámaszthatják a cortexben találtak, ahol az interneuronok intrinsic membránsajátságai a kortikális gamma oszcillációs aktivitást képesek meghatározni (Moca és mtsai. 2014). A fenti feltételezésnek ellentmond azonban az, hogy mély agyi elektróda beültetésén átesett Parkinson-kóros betegeken végzett mérések nem támogatják egyértelműen a PPN gamma oszcillációinak meglétét. Mindössze egyetlen tanulmány volt képes extracelluláris gamma aktivitást mérni a

PPN-ben (Fraix és mtsai. 2013), számos más munkacsoport alfa és béta oszcillációkat talált (ld. Li és Zhang. 2015). Érdekes módon, ellentmondásos adatok vannak a PPN oszcillációk frekvenciáinak rostrocaudalis eloszlásában a humán PPN-ben és a rágcsálók PPN- jében. Humán alanyoknál alacsonyabb frekvenciákat inkább a PPN caudalis területén találtak, ellentétben a mi mérésinkkel és az irodalmi adatokkal, melyeket rágcsálók individuális PPN neuronjain mértek. Az ellentmondás a rágcsálókon mért patch clamp mérések és a humán mintákon való mérések között azt sugallja, hogy még komplexebb kapcsolat lehet az intrinsic membrán oszcillációk és a helyi membrán potenciálok vagy agyi mezőpotenciálok között, mint azt korábban feltételezték. Nem zárható ki ugyanakkor fontos fajok közötti különbségek a neuronok oszcillációs aktivitásában.

Azt is demonstráltuk, hogy a HTO-k frekvenciája egyenesen arányos az ugyanazon neuron átlagos tüzelési frekvenciájával és a HTO-k gátlása szignifikánsan növeli a tüzelési frekvenciát. Nehéz elképzelni, hogy bármilyen, -30 mV felett megjelenő jelenség érdemi hatást képezt gyakorolni egy éppen folyamatban lévő akciós potenciálra. Valószínűnek tartjuk, hogy a membránpotenciál-oszcillációk és az akcióspotenciál-tüzelési frekvencia között az a kapcsolat, hogy mindkét jelenséget ugyanazon ioncsatorna készlet hozza létre, de amíg a membránpotenciál oszcillációk fiziológiástól távolabb eső körülmények (TTX jelenlétében, depolarizáló rámpa protokoll) között mérhetők, addig az akciós potenciál tüzelés pedig ugyanannak a sejtmembránnak a fiziológiás körülmények között adott válasza.

Az, hogy a HTO-k effektíven meghatározzák a tüzelési frekvenciát, egy újabb érvet képeznek amellet, hogy a HTO-k a szómáról származnak, hiszen az akciós potenciálokat leghatékonyabban az axondombhoz közelebb lévő ioncsatornák képesek modulálni.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy megerősítettük a HTO-k létezését és bemutattuk rostrocaudalis különbségeit a PPN-ben. A HTO-k nagyobb valószínűséggel a szómán generálódnak, semmint a dendriten. Ez a jelenség képes meghatározni a neuronok akcióspotenciál-tüzelési frekvenciáját.

7.1.5. A neuronok funkcionális tulajdonságainak topográfiai különbségei

A PPN különböző projekciói jól ismert topográfiailag szervezettek. A caudalis PPN az area tegmentalis ventralis és a striatum dorsomedialis területéhez ad bemenetet, míg a rostralis PPN a substantia nigra pars compacta területét, valamint a dorsolateralis striatumot innerválja (Mena-Segovia és Bolam, 2017; Dautan és mtsai. 2014). Ezek a tények összhangban

vannak a PPN caudalis és rostralis területei közötti ismert funkcionális különbségekkel. Kisebb látenciával és nagyobb valószínűséggel váltottak ki acetilkolin-indukált REM alvást, ha a rostralis és nem a caudalis PPN-be adták az injekciót (Baghdoyan és mtsai. 1987). Emberek esetében a dorsalis PPN mutatott nagyobb aktivitást abban az esetben, ha az egyén képzeletben elkezdett sétálni, majd a ventralis PPN aktiválódott ezzel párhuzamosan akkor, amikor nagyobb sebességgel kezdett képzeletben mozogni (Karachi és mtsai. 2012). Patofiziológiai tanulmányok ugyancsak feltártak rostrocaudális különbségeket: Parkinson-kóros állatmodell esetében a rostralis PPN mély agyi stimulációját követően rosszabbodott a járás, majd dermedéshez vezetett; míg a caudalis PPN stimulálása esetén a járás enyhén javulni kezdett (Gut és Winn, 2015). Egy másik Parkinson-kóros állatmodell esetében a kolinerg neuronok száma jelentős mértékben lecsökkent, és a galanint tartalmazó sejtek száma pedig megemelkedett a rostralis PPN területén, de a caudalis PPN-ben ez nem, vagy csak kisebb mértékben történt meg (Elson és mtsai. 2018).

Tanulmányunkban azt mutattuk ki, hogy számos membrántulajdonság rostrocaudalis megoszlással rendelkezik. Az LTS jelenléte a rostralis elhelyezkedő kolinerg neuronokra jellemző, míg a caudalis területen késői tüzelésű és lassú A-árammal rendelkező kolinerg neuronokat találtunk. Ezen kívül a HTO-k jelenléte (és ennek megfelelően a tüzelési frekvencia) is szintén mutatott rostrocaudális eloszlást. Ezek az *in vitro* rostrocaudalis különbségek állhatnak a háttérben az *in vivo* körülmények között találtak különbségeknél. Reméljük és feltételezzük, hogy az általunk bemutatott *in vitro* eredmények segítik a további, transzgen egérmodellt használó *in vivo* kísérletek tervezését és értékelését. Reméljük azt is, hogy a fenti adatok hozzájárulnak a PPN különböző területein terápiás céllal alkalmazott mély agyi stimuláció eltérő kimeneteleinek megértéséhez.

7.2. A PPN-re ható orexinerg neuromodulációs hatások vizsgálata

A laboratórium korábbi kutatásainak folytatásaként megvizsgáltuk az orexinnek a PPN neuronok tónusos neuronális áramaira, EPSC-ire és SIC-eire gyakorolt hatását. Korrelációkat is kerestünk ezen paraméterek és a korábbi, a SIC-eken érvényesülő más neuromodulációs hatások feltáró kutatási eredményeink között (Kovács és Pál, 2017). Azt találtuk, hogy orexin hatására a SIC aktivitás növekedett abban az esetben, ha a kontroll aktivitás alacsony volt, míg csökkent abban az esetben, ha a kontrollban magas volt a SIC aktivitás. A SIC-eken érvényesülő orexinerg hatás független az EPSC-kre és tónusos inward áramokra gyakorolt hatásaitól. Ezek a megfigyelések egybevágtak a korábbi, kannabinoid, kolinerg vagy szerotoninerger neuromodulációs hatásokkal kapcsolatban tett megfigyelésekkel. Egy fontos különbséget találtunk az orexin és a többi neuromodulációs hatások között: az orexin csaknem soha nem váltott ki tónusos kifelé irányuló áramot.

Vita tárgya lehet az, hogy a SIC-eket kiváltó asztrocita aktiváció az orexin direkt vagy indirekt hatásának következménye. A SIC-ekre kifejtett orexinerg hatás asztrocitákra gyakorolt direkt hatás következménye is lehet. Jól ismert, hogy OX1R és OX2R receptorok is megtalálhatók asztrocita sejtenyészetekeken (Shu és mtsai. 2014; 2017), de OX1R receptort nem találtak *in situ* PPN asztrocitákon, csak neuronokon (Darwinkel és mtsai. 2014). Mivel az OX2R szintén megtalálható a PPN-ben neuronokon és az asztrocitákon is, így esetleg azok direkt aktivációja vezethet a SIC-ek megjelenéséhez. Mindezek mellett azonban feltételezhető az is, hogy az asztrociták a megnövekedett átlagos neuronális aktivitásra reagálnak, mely végül az aktivációjukhoz és gliotranszmitter felszabaduláshoz vezet (ld. Carmignoto és Fellin, 2006).

Másik fontos kérdés, hogy vajon az orexin SIC-ekre gyakorolt hatása nevezhető-e fizioiógias jelenség modelljének, vagy patofizioiógiai mechanizmusokat képvisel-e. Az orexin receptorok és a glutamát transzporterek száma egyes neurodegeneratív betegségekben és cerebrális ischaemiában megnőtt, és protektív szerepet tölthetnek be ezekben a folyamatokban (Shu és mtsai. 2017; Nakamachi és mtsai. 2005; Feng és mtsai. 2014). A mi kísérleti körülményeink –a magnéziummentes oldat miatt- nem teljesen tekinthetőek fizioiógias körülményeknek: a magnéziummentes mérőoldat sok esetben a kérgi hiperexcitabilitás modelljeként használatos (Derchansky és mtsai. 2004). Amiért mégis ezt a kísérleti körülményt választottuk, annak az az oka, hogy ez az oldat bevett módszer a SIC-ek vizsgálatához. Az NMDA receptorok magnéziumblokádjának elmozdítása miatt ugyanis a SIC-ek jobban detektálhatók, mind a SIC-ek frekvenciája és amplitúdója is megduplázódik (Angulo és mtsai.

2004; D'Ascenso és mtsai. 2007, Kovács és Pál, 2017). Feltételezzük, hogy a SIC-ek, valamint a SIC ekre gyakorolt orexinerg hatások fiziológias körülmények között is jelen vannak, de valószínűleg felerősödnek pathológias körülmények között.

Különböző neuromodulációs hatásoknak, agonistáknak a SIC-ekre gyakorolt hatásai függenek a kontroll SIC aktivitásától. Ennek egy elképzelhető háttere, hogy az asztrociták a neuromodulációs hatásokra megnövekedett neuronális aktivitásra válaszolva megnövelik az extraszinaptikus glutamát koncentrációját (Carmignoto és Fellin, 2006; 7. ábra, C-D). Ha az extraszinaptikus glutamát koncentráció eredetileg alacsony volt, a glutamát szintjének emelkedése extraszinaptikus NMDA receptorokat aktivál és a SIC aktivitás (frekvencia, amplitúdó, töltésmozgás) növekedéséhez vezet. Abban az esetben, ha a kiinduló extraszinaptikus glutamát koncentráció magas volt, a glutamát szintjének további növekedése az NMDA receptorok deszenzitizációjához vezet (Kovács és Pál, 2017; Vyklicky, 1993).

Eredményeink alátámasztják azt az elméletet, hogy a PPN-ben a SIC-eket különböző neuromodulációs mechanizmusok egységesen modulálják, ezáltal létezik a neuromodulációs mechanizmusoknak egy közös, asztrocita-függő komponense. Ez az asztrocita-függő komponens azonban feltehetően nem, vagy legalább részben nem az asztrociták direkt aktivációjának a következménye, hanem válasz a neuromodulációs hatások által megváltoztatott neuronális aktivitásra. A PPN-ben a SIC-ek esetlegesen egy asztrocita-függő homeosztatis szabályozás részei. Korábbi munkánkban megmutattuk, hogy a SIC-ek nem szinkronizálják a szomszédos neuronokat és képesek egy akciós potenciál vagy egy rövidebb akcióspotenciál-sorozat kiváltására. Mivel 'random' akciós potenciálok megjelenéséhez vezetnek, potenciálisan egy deszinkronizációs mechanizmust képviselhetnek. A PPN asztrocita-függő neuromodulációjáról jelenleg azonban csak *in vitro* adatok állnak rendelkezésünkre, így előfordulhat, hogy a szelet-elektrofiziológiai modell túlbecsüli (vagy éppen alábecsüli) annak a jelentőségét. Az asztrocita-függő neuromodulációs folyamatok jobb megértése érdekében laboratóriumunk a jövőben *in vivo* kutatások bevezetését is tervezi.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A nucleus pedunculopontinus a retikuláris aktivációs rendszer egy kolinerg magja. Élettani jelentőségét az adja, hogy az alvás-ébrenlét ciklusok szabályozásában, a szenzoros kapuzásban és a mozgásszabályozásban játszik fontos szerepet.

A magot bár kolinerg struktúráként ismerik, GABAerg és glutamaterg neuronok is megtalálhatóak itt szép számban. A PPN neuronjainak csoportosítására számos kísérlet történt. Az *in vitro* kísérleteken alapuló csoportosítás az A-áram és az alacsony küszöbű membránpotenciál tüskék alapján különített el 3 vagy 4 funkcionális csoportot.

A jelen munka első részében a korábbi, *post hoc* neurokémiai sejtazonosításra épülő csoportosítást vizsgáltuk felül transzgen technikán alapuló sejtazonosítás segítségével. Megállapítottuk, hogy az A-árammal rendelkező kolinerg neuronok két további csoportra, korai és késői tüzelésű neuronokra bonthatóak. Kimutattuk továbbá, hogy az A-áram, az alacsony küszöbű tüskék és a magas küszöbű membránpotenciál-oszcillációk is változó eloszlást mutatnak a rostrocaudalis tengely mentén. A rostrocaudalis tengely mentén általunk leírt számos különbség potenciálisan a Parkinson-kór esetén végzett mély agyi stimuláció hely szerint különböző kimeneteleinek a sejszintű elektrofiziológiai hátterét jelentheti.

A PPN számos, az alvás-ébrenlét ciklusokat befolyásoló neuromodulációs mechanizmus célpontja. Korábbi munkánkban bemutattuk, hogy a kolinerg, szerotoninerg és kannabinoid neuromodulációs hatásnak egymással átfedő, asztrocita-függő komponensei is vannak. Ilyenek voltak az asztrocita aktiváció hatására a neuronokon kialakuló tónusos befelé és kifelé irányuló áramok és a fázisos lassú befelé irányuló áramokra (SIC-ekre) gyakorolt összetett hatás.

Az orexinerg neuromoduláció némileg elüt az eddig vizsgáltaktól, hiszen a többféle tónusos hatás helyett ez tudottan a neuronok homogén depolarizációját okozza. Célul tűztük ki, hogy az orexinnek a SIC-ekre kifejtett hatását vizsgáljuk. Megállapítottuk, hogy ha a kiinduló SIC aktivitás alacsony volt, az orexin növelte azt; míg ha a SIC aktivitás kontroll körülmények között magas volt, az orexin csökkentette azt. Ez a feltehetően NMDA receptor aktiváció vagy deszenzitizáció által okozott jelenség megegyezett az összes, általunk vizsgált neuromodulációs hatás esetén. A megfigyelt jelenség feltehetően egy aspecifikus, közös, asztrocitafüggő komponense a neuromodulációs hatásoknak, és a neuronális deszinkronizáció mértékét hivatott szabályozni.

9. SUMMARY

The pedunculopontine nucleus is a cholinergic member of the reticular activating system. Its main physiological functions are the participation in regulation of sleep-wakefulness cycles, sensory gating and movement.

Although this nucleus is known as a cholinergic structure, a great number of GABAergic and glutamatergic neurons can also be found here. Several attempts aimed to group these neurons. Groupings based on *in vitro* experiments distinguished 3 or 4 functional groups according to the existence of the A-current and low threshold membrane potential spikes.

In the first part of my work, we re-assessed grouping based on post hoc neurochemical cell identification by using cell identification with transgenic techniques. We found that cholinergic neurons possessing A-current can be further distinguished as early- and late-firing neurons. Furthermore, we demonstrated that the A-current, the low threshold spikes and the high threshold membrane potential oscillations have uneven distribution along the rostrocaudal axis of the nucleus. Numerous rostrocaudal differences in functional neuronal properties might serve as a background of the different outcomes of deep brain stimulation in Parkinson's disease targeting different parts of the pedunculopontine nucleus.

The PPN is a target of several neuromodulatory mechanisms influencing sleep-wakefulness cycles. We previously demonstrated that cholinergic, serotonergic and cannabinoid neuromodulatory actions include overlapping, astrocyte-mediated components. Compound actions of neuromodulatory agents were demonstrated on slow inward currents (SICs) as well as tonic inward and outward currents were elicited by them.

The orexinergic neuromodulation is distinct from the ones examined before, as it is known to exert exclusively depolarizing actions on neurons. We aimed to investigate actions of orexin on SICs. We found that the orexin stimulated SIC activity if it was low under control conditions, whereas it inhibited SIC activity if it was high in control. This phenomenon caused by NMDA receptor activation or desensitization was identical in case of all investigated neuromodulatory agents. The observed phenomenon is potentially an aspecific, common, astrocyte-dependent component of neuromodulatory actions and its role might be the regulation of neuronal desynchronization.

10. IRODALOMJEGYZÉK

- Adamantidis AR. Zhang F. Aravanis AM. Deisseroth K. de Lecea L. (2007) Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature* 450 (7168):420-4
- Alonso A. Llinás RR. (1989) Subthreshold Na⁺-dependent theta-like rhythmicity in stellate cells of entorhinal cortex layer II. *Nature* 342 (6246):175-177
- Angulo MC. Kozlov AS. Charpak S. Audinat E. (2004) Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J Neurosci* 24 (31) 6920-6927
- Araque, A. Martin, ED. Perea G. Arellano JI. and Buno W. (2002) Synaptically released acetylcholine evokes Ca²⁺ elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J Neurosci*. 22, 2443–2450
- Araque A. Parpura V. Sanzgiri RP. Haydon PG. (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci*. 22, 208–215
- Azzopardi E. Louttit AG. DeOliveira C. Laviolette SR. Schmid S. (2018) The role of cholinergic midbrain neurons in startle and prepulse inhibition. *J Neurosci*. 38 (41):8798-8808
- Bäckberg M. Hervieu G. Wilson S. Meister B. (2002) Orexin receptor-1 (OX-R1) immunoreactivity in chemically identified neurons of the hypothalamus: focus on orexin targets involved in control of food and water intake. *Eur J Neurosci*. 15 (2):315-28
- Baghdoyan HA. Rodrigo- Angulo ML. McCarley RW. Hobson A. (1987) A neuroanatomical gradient in pontine tegmentum for the cholinceptive induction of desynchronized sleep signs. *Brain Research* 414 (2):245-61
- Bardóczy Z. Pál B. Kőszeghy Á. Wilhelm T. Watanabe M. Záborszky L. Liposits Z. Kalló I. (2017) Glycinergic input to the mouse basal forebrain cholinergic neurons. *J Neurosci* 37 (39):9534-9549
- Bardoni R. Ghirri A. Zonta M. Betelli C. Vitale G. Ruggieri V. Sandrini M. Carmignoto G. (2010) Glutamate-mediated astrocyte-to-neuron signalling in the rat dorsal horn. *J Physiol*. 588 (Pt 5) 831–846

- Barroso-Chinea P. Rico AJ. Conte-Perales L. Gómez-Bautista V. Luquin N. Sierra S. Roda E. Lanciego J.L. (2011) Glutamatergic and cholinergic pedunculopontine neurons innervate the thalamic parafascicular nucleus in rats: changes following experimental parkinsonism. *Brain Struct. Funct.* 216, 319–330
- Benarroch EE. (2013) Pedunculopontine nucleus: functional organization and clinical implications. *Neurology.* 19;80 (12):1148-55
- Beppu K. Sasaki T. Tanaka K. F. Yamanaka A. Fukazawa Y. Shigemoto R. Matsui K. (2014) Optogenetic countering of glial acidosis suppresses glial glutamate release and ischemic brain damage. *Neuron* 81, 314–320
- Bettendorff L. Sallanon-Moulin M. Touret M. Wins P. Margineanu I. Schoffeniels E. (1996) Paradoxical sleep deprivation increases the content of glutamate and glutamine in rat cerebral cortex. *Sleep.* 19(1):65-71
- Bevan MD. Bolam JP. (1995) Cholinergic, GABAergic, and glutamate-enriched inputs from the mesopontine tegmentum to the subthalamic nucleus in the rat. *J Neurosci.* 15, 7105-7120
- Bezzi P. Gundersen V. Galbete J. L. Seifert G. Steinhäuser C. Pilati E. Volterra A. (2004) Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci.* 7, 613–620
- Birnbaum SG. Varga AW. Yuan LL. Anderson AE. Sweatt JD. Schrader LA. (2004) Structure and function of Kv4-family transient potassium channels. *Physiological Reviews* 84 (3):803-33
- Bolam, JP. Francis, CM. and Henderson, Z. (1991) Cholinergic input to dopaminergic neurons in the substantia nigra: a double immunocytochemical study. *Neuroscience* 41, 483–494
- Bordás C. Kovács A. Pál B. (2015) The M-current contributes to high threshold membrane potential oscillations in a cell-type-specific way in the pedunculopontine nucleus of mice. *Front Cell Neurosci.* 9, 121
- Borgland SL. Taha SA. Sarti F. Fields HL. Bonci A. (2006) Orexin A in the VTA is critical for the induction of synaptic plasticity and behavioral sensitization to cocaine. *Neuron.* 49 (4):589-601

- Boucetta S. Cisse Y. Mainville L. Morales M. Jones EB. (2014) Discharge profiles across the sleep–waking cycle of identified cholinergic, GABAergic, and glutamatergic neurons in the pontomesencephalic tegmentum of the rat. *J Neurosci* 34 (13):4708-27
- Bourgin P, Huitrón-Résendiz S, Spier AD, Fabre V, Morte B, Criado JR, Sutcliffe JG, Henriksen SJ, de Lecea L. (2000) Hypocretin-1 modulates rapid eye movement sleep through activation of locus coeruleus neurons. *J Neurosci.* 20(20):7760-5
- Brown, D. A. (1988) *Ion Channels Vol. 1* (ed. Narahashi, T.) 55–99 (Plenum, New York)
- Brown RE. Sergeeva OA. Eriksson KS. Haas HL. (2002) Convergent excitation of dorsal raphe serotonin neurons by multiple arousal systems (orexin/hypocretin, histamine and noradrenaline). *J Neurosci.* 22 (20): 8850-9
- Burlet S. Tyler CJ. Leonard CS. (2002) Direct and indirect excitation of laterodorsal tegmental neurons by Hypocretin/Orexin peptides: implications for wakefulness and narcolepsy. *J Neurosci.* 22 (7):2862-72
- Cajal, S. Ramon (1913) Un nuevo proceder para la impregnacion de la neuroglia. *Bol Soc Esp Biol.* II, 104-108
- Carmignoto G. Fellin T. (2006) Glutamate release from astrocytes as a non-synaptic mechanism for neuronal synchronization in the hippocampus. *J Physiol Paris.* 99 (2-3):98-102
- Charara A. Smith Y. and Parent A. (1996) Glutamatergic inputs from the pedunculo-pontine nucleus to midbrain dopaminergic neurons in primates: Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin anterograde labeling combined with postembedding glutamate and GABA immunohistochemistry. *J. Comp Neurol.* 364, 254–266
- Charpak S. Gahwiler BH. Do KQ. Knopfel T. (1990) Potassium conductances in hippocampal neurons blocked by excitatory amino-acid transmitters. *Nature* 347:765–67
- Chemelli RM. Willie JT. Sinton CM. Elmquist JK. Scammell T. Lee C. Richardson JA. Williams SC. Xiong Y. Kisanuki Y. Fitch TE. Nakazato M. Hammer RE. Saper CB. Yanagisawa M. (1999) Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell.* 98 (4):437-51
- Chen N. Sugihara H. Sharma J. Perea G. Petracz J. Le C. Sur M. (2012) Nucleus basalis-enabled stimulus-specific plasticity in the visual cortex is mediated by astrocytes. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 109, E2832–E2841

Clarke PB, Hommer DW, Pert A, Skirboll LR. (1987) Innervation of substantia nigra neurons by cholinergic afferents from pedunculopontine nucleus in the rat: neuroanatomical and electrophysiological evidence. *Neuroscience* 23, 1011–1019

Cluderay JE, Harrison DC, Hervieu GJ. (2002) Protein distribution of the orexin-2 receptor in the rat central nervous system. *Regul Pept.* 104(1-3):131-44

Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B. (1999) Molecular diversity of K⁺ channels. *Annals of the New York Academy of Science* 868:233-85

Cornwall J, Cooper JD, Phillipson OT. (1990) Afferent and efferent connections of the laterodorsal tegmental nucleus in the rat. *Brain Res Bull.* 25, 271–284

Cox J, Pinto L, Dan Y. (2016) Calcium imaging of sleep-wake related neuronal activity in the dorsal pons. *Nat Commun.* 7, 10763

Darwinkel A, Stanić D, Booth LC, May CN, Lawrence AJ, Yao ST. (2014) Distribution of orexin-1 receptor-green fluorescent protein- (OX1-GFP) expressing neurons in the mouse brain stem and pons: Co-localization with tyrosine hydroxylase and neuronal nitric oxide synthase. *Neuroscience.* 278:253-64

D'Ascenso M, Fellin T, Terunuma M, Revilla-Sanchez R, Meaney DF, Aubertson YP, Moss JS, Haydon PG. (2007) mGluR5 stimulates gliotransmission in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 104, 1995–2000

Dash MB, Douglas CL, Vyazovskiy VV, Cirelli C, Tononi G. (2009) Long-term homeostasis of extracellular glutamate in the rat cerebral cortex across sleep and waking states. *J Neurosci.* 29(3):620-9

Datta S, Siwek DF. (1997) Excitation of the brain stem pedunculopontine tegmentum cholinergic cells induces wakefulness and REM Sleep. *J Neurophysiol* 77 (6):2975-88

Dautan D, Hacıoglu Bay H, Bolam JP, Gerdjikov TV, and Mena-Segovia J. (2016a). Extrinsic sources of cholinergic innervation of the striatal complex: a whole-brain mapping analysis. *Front Neuroanat.* 10, 1

Dautan D, Huerta-Ocampo I, Witten I.B, Deisseroth K, Bolam, JP, Gerdjikov T, Mena-Segovia J. (2014) A major external source of cholinergic innervation of the striatum and nucleus accumbens originates in the brainstem. *J. Neurosci.* 34, 4509–4518

- Dautan D. Souza AS. Huerta-Ocampo I. Valencia M. Assous M. Witten IB. Deisseroth K. Tepper JM. Bolam JP. Gerdjikov TV. Mena- Segovia J. (2016). Segregated cholinergic transmission modulates dopamine neurons integrated in distinct functional circuits. *Nat Neurosci.* 19, 1025–1033
- Derchansky M. Shahar E. Wennberg RA. Samoilova M. Jahromi SS. Abdelmalik PA. Zhang L. Carlen PL. (2004) Model of frequent, recurrent, and spontaneous seizures in the intact mouse hippocampus. *Hippocampus.* 14 (8):935-47
- Deurveilher S. Hennevin E. (2001) Lesions of the pedunclopontine tegmental nucleus reduce paradoxical sleep (PS) propensity: evidence from a short-term PS deprivation study in rats. *Eur J Neurosci.* 13, 1963–1976
- Dun NJ. Dun SL. Hwang LL. Forstermann U. (1995) Infrequent co-existence of nitric oxide synthase and parvalbumin, calbindin and calretinin immunoreactivity in rat pontine neurons. *Neurosci Lett.* 191, 165–168
- Eggermann E. Serafin M. Bayer L. Machard D. Saint-Mleux B. Jones BE. Mühlethaler M. (2001) Orexins/hypocretins excite basal forebrain cholinergic neurones. *Neuroscience.* 108 (2):177-81
- Elias CF. Saper CB. Maratos-Flier E. Tritos NA. Lee C. Kelly J. Tatro JB. Hoffman GE. Ollmann MM, Barsh GS, Sakurai T, Yanagisawa M, Elmquist JK. (1998) Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol.* 402(4):442-59
- Elson JL. Kochaj R. Reynolds R. Pienaar IS. (2018) Temporal spatial profiling of pedunclopontine galanin-cholinergic. Neurons in the lactacystin rat model of Parkinson's disease. *Neurotox Res.* 34:16–31
- Fadel J. Deutch AY. (2002) Anatomical substrates of orexin-dopamine interactions: lateral hypothalamic projections to the ventral tegmental area. *Neuroscience.* 111 (2):379-87
- Fellin T. Pascual O. Gobbo S. Pozzan T. Haydon P. G. Carmignoto G. (2004) Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43, 729–743

- Feng Y. Liu T. Li XQ. Liu Y. Zhu XY. Jankovic J. Pan TH. Wu YC. (2014) Neuroprotection by orexin-A via HIF-1 α induction in a cellular model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 579:35-40
- Figueiredo M. Lane S. Tang F. Liu B. H. Hewinson J. Marina N. Kasymov V. Souslova EA. Chudalo DM. Gourine AV. Teschemacher AG. Kasparov S. (2011) Optogenetic experimentation on astrocytes. *Exp Physiol.* 96, 40–50
- Fleming TM. Scott V. Naskar K. Joe N. Brown CH. Stern JE. (2011) State-dependent changes in astrocyte regulation of extrasynaptic NMDA receptor signalling in neurosecretory neurons. *J Physiol.* 589, 3929–3941
- Ford B. Holmes CJ. Mainville L. Jones BE. (1995) GABAergic neurons in the rat pontomesencephalic tegmentum: codistribution with cholinergic and other tegmental neurons projecting to the posterior lateral hypothalamus. *J Comp Neurol.* 363, 177–196
- Fortin M. Parent A. (1999) Calretinin-immunoreactive neurons in primate pedunculopontine and laterodorsal tegmental nuclei. *Neuroscience* 88, 535–547
- Fraix V. Bastin J. David O. Goetz L. Ferraye M. Benabid AL. Chabardes S. Pollak P. Debû B. (2013) Pedunculopontine nucleus area oscillations during stance, stepping and freezing in Parkinson's disease. *PloS One* 8 (12) 83919
- Fellin T, Pozzan T, Carmignoto G. (2006) Purinergic receptors mediate two distinct glutamate release pathways in hippocampal astrocytes. *J Biol Chem.* 281(7):4274-84
- Frank MG. (2013) Astroglial regulation of sleep homeostasis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 23, 812–818
- Fuller PM. Sherman D. Pedersen NP. Saper CB. Lu J. (2011) Reassessment of the structural basis of the ascending arousal system. *J Comp Neurol.* 519, 933–956
- Garcia-Marin V. Garcia-Lopez P. Freire M. (2007) Cajal's contributions to glia research. *Trends Neurosci,* 30:479-487
- Garcia-Rill E. Kezunovic N. Hyde J. Simon C. Beck P. Urbano FJ. (2013) Coherence and frequency in the reticular activating system (RAS). *Sleep Med Rev.* 17(3):227-38
- Grace KP. Vanstone LE. Horner RL. (2014) Endogenous cholinergic input to the pontine REM sleep generator is not required for REM sleep to occur. *J Neurosci.* 34, 14198–14209

Greco MA, Shiromani PJ. (2001) Hypocretin receptor protein and mRNA expression in the dorsolateral pons of rats. *Brain Res Mol Brain Res.* 88 (1-2):176-82

Gut NK, Winn P. (2015) Deep brain stimulation of different pedunculopontine targets in a novel rodent model of parkinsonism. *J Neurosci* 35 (12):4792-803

Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, Benham CD, Taylor SG, Routledge C, Hemmati P, Munton RP, Ashmeade TE, Shah AS, Hatcher JP, Hatcher PD, Jones DN, Smith MI, Piper DC, Hunter AJ, Porter RA, Upton N. (1999) Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96 (19):10911-6

Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Sugiyama F, Yagami K, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T. (2001) Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron.* 30 (2):345-54

Harris GC, Wimmer M, Aston-Jones G. (2005) A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature.* 437(7058):556-9

Hervieu GJ, Cluderay JE, Harrison DC, Roberts JC, Leslie RA. (2001) Gene expression and protein distribution of the orexin-1 receptor in the rat brain and spinal cord. *Neuroscience.* 103 (3):777-97

Hondo M, Nagai K, Ohno K, Kisanuki Y, Willie JT, Watanabe T, Yanagisawa M, Sakurai T. (2010) Histamine-1 receptor is not required as a downstream effector of orexin-2 receptor in maintenance of basal sleep/wake states. *Acta Physiol (Oxf).* 198(3):287-94

Huitron-Resendiz S, Kristensen MP, Sánchez-Alavez M, Clark SD, Grupke SL, Tyler C, Suzuki C, Nothacker HP, Civelli O, Criado JR, Henriksen SJ, Leonard CS, de Lecea L. (2005) Urotensin II modulates rapid eye movement sleep through activation of brainstem cholinergic neurons. *J Neurosci.* 25 (23):5465-74

Inutsuka A, Yamanaka A. (2013) The physiological role of orexin/hypocretin neurons in the regulation of sleep/wakefulness and neuroendocrine functions. *Front Endocrinol (Lausanne).* 4:18

Ishibashi M, Gumenchuk I, Kang B, Steger C, Lynn E, Molina NE, Eisenberg LM, Leonard CS. (2015) Orexin receptor activation generates gamma band input to cholinergic and serotonergic

arousal system neurons and drives an intrinsic Ca^{2+} -dependent resonance in LDT and PPT cholinergic neurons. *Frontiers in Neurology*, 6:120

Jabaudon D. Shimamoto K. Yasuda-Kamatani Y. Scanziani M. Gähwiler B. H. Gerber U. (1999) Inhibition of uptake unmasks rapid extracellular turnover of glutamate of nonvesicular origin. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 96, 8733–8738

Jackson A. Crossman, AR. (1983) Nucleus tegmenti pedunculopontinus: efferent connections with special reference to the basal ganglia, studied in the rat by anterograde and retrograde transport of horseradish peroxidase. *Neurosci.* 10, 725–765

Kamondi A. Williams JA. Hutcheon B. Reiner PB. (1992) Membrane properties of mesopontine cholinergic neurons studied with the whole-cell patch-clamp technique: implications for behavioral state control. *J Neurophysiol.* 68 (4):1359–1372

Kandel ER. Schwartz JH. Jessel TM. Siegelbaum SA. Hudspeth AJ. (2013) *Principles of neural science.* 5. kiadás, McGraw-Hill

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

Kanold PO. Manis PB. (1999) Transient potassium currents regulate the discharge patterns of dorsal cochlear nucleus pyramidal cells. *J Neurosci* 19 (6):2195-208

Karachi C. André A. Bertasi E. Bardinet E. Lehericy S. Bernard FA. (2012) Functional parcellation of the lateral mesencephalus. *J Neurosci.* 32 (27):9396-401

Kezunovic N. Urbano FJ. Simon C. Hyde J. Smith K. Garcia-Rill E. (2011) Mechanism behind gamma band activity in the pedunculopontine nucleus. *Eur J Neurosci.* 34 (3):404–415

Kezunovic, N. Hyde, J. Goitia, B. Bisagno, V. Urbano, F. J. Garcia-Rill, E. (2013) Muscarinic modulation of high frequency oscillations in pedunculopontine neurons. *Front Neurol.* 4:176

Kim J. Nakajima K. Oomura Y. Wayner MJ. Sasaki K. (2009) Electrophysiological effects of orexins/hypocretins on pedunculopontine tegmental neurons in rats: an in vitro study. *Peptides.* 30 (2):191-209

- Koch M. Kungel M. Herbert H. (1993) Cholinergic neurons in the pedunclopontine tegmental nucleus are involved in the mediation of prepulse inhibition of the acoustic startle response in the rat. *Exp Brain Res.* 97(1):71-82
- Koch M. (1999) The neurobiology of startle. *Prog Neurobiol.* 59(2):107-28
- Kodama T. Honda Y. (1999) Acetylcholine and glutamate release during sleep-wakefulness in the pedunclopontine tegmental nucleus and norepinephrine changes regulated by nitric oxide. *Psychiatry Clin Neurosci.* 53 (2):109-11
- Kohlmeier KA. Watanabe S. Tyler CJ, Burlet S. Leonard CS. (2008) Dual orexin actions on dorsal raphe and laterodorsal tegmentum neurons: noisy cation current activation and selective enhancement of Ca^{2+} transients mediated by L-type calcium channels. *Journal of Neurophysiology*, 100 (4):2265-81
- Korotkova TM. Sergeeva OA. Eriksson KS, Haas HL. Brown RE. (2003) Excitation of ventral tegmental area dopaminergic and nondopaminergic neurons by orexins/hypocretins. *J Neurosci.* 23 (1):7-11
- Kovács A. Bordás C. Bíró T. Hegyi Z. Antal M. Szücs P. Pál B. (2017) Direct presynaptic and indirect astrocyte-mediated mechanisms both contribute to endocannabinoid signaling in the pedunclopontine nucleus of mice. *Brain Struct Funct.* 222 (1):247–266
- Kovács A. Pál B. (2017) Astrocyte-dependent slow inward currents (SICs) participate in neuromodulatory mechanisms in the pedunclopontine nucleus (PPN). *Front Cell Neurosci.* 11:16
- Kozlov AS. Angulo MC. Audinat E. Charpak S. (2006) Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 103, 10058–10063
- Kőszeghy Á. Kovács A. Bíró T. Szücs P. Vincze J. Hegyi Z. Antal M. Pál B. (2015) Endocannabinoid signaling modulates neurons of the pedunclopontine nucleus (PPN) via astrocytes. *Brain Struct Funct.* 220 (5):3023-41
- Kroeger D. Ferrari LL. Petit G. Mahoney CE. Fuller PM. Arrigoni E. Scammell TE. (2017) Cholinergic, glutamatergic, and GABAergic neurons of the pedunclopontine tegmental nucleus have distinct effects on sleep/wake behavior in mice. *J Neurosci.* 37 (5):1352–1366

- Lavoie B. Parent A. (1994) Pedunculopontine nucleus in the squirrel monkey: projections to the basal ganglia as revealed by anterograde tract tracing methods. *J. Comp. Neurol.* 344, 210–231
- Le Meur K. Galante M. Angulo M. C. Audinat E. (2007) Tonic activation of NMDA receptors by ambient glutamate of non-synaptic origin in the rat hippocampus. *J Physiol.* 580(Pt 2), 373–383
- Leonard CS. Llinás R. (1994) Serotonergic and cholinergic inhibition of mesopontine cholinergic neurons controlling rem sleep: an in vitro electrophysiological study. *Neuroscience.* 59 (2):309-330
- Leonard CS. Llinas R. (1988) Electrophysiology of thalamic-projecting cholinergic brainstem neurons and their inhibition by Ach. *Neurosci Abstr.* 14:297
- Leonard CS. Llinas RR. (1990) Serotonin inhibits mesopontine cholinergic neurons in vitro. *Neurosci Abstr.* 16, 1233
- Lin L. Faraco J. Li R. Kadotani H. Rogers W. Lin X. Qiu X. de Jong PJ. Nishino S. Mignot E. (1999) The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell.* 98 (3):365-76
- Li M. Zhang W. (2015) Oscillations in pedunculopontine nucleus in Parkinson's disease and its relationship with deep brain stimulation. *Front. in Neural Circ.* 9:47
- Lindsley DB. Bowden JW. Magoun, HW. (1949) Effect upon the EEG of acute injury to the brain stem activating system. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 1, 475–486
- Llinás RR. Grace AA. Yarom Y. (1991) In vitro neurons in mammalian cortical layer 4 exhibit intrinsic oscillatory activity in the 10- to 50-Hz frequency range. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88 (3):897-901
- Luster B, D'Onofrio S, Urbano F, Garcia-Rill E. (2015) High-threshold Ca²⁺ channels behind gamma band activity in the pedunculopontine nucleus (PPN). *Physiol Rep.* 3 (6). pii: e12431
- Luquin E. Huerta I. Aymerich MA. Mengual E. (2018) Stereological estimates of glutamatergic, GABAergic, and cholinergic neurons in the pedunculopontine and laterodorsal tegmental nuclei in the rat. *Frontiers in Neuroanatomy* 12: 34

Marcus JN. Aschkenasi CJ. Lee CE. Chemelli RM. Saper CB. Yanagisawa M. Elmquist JK. (2001) Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol.* 435(1):6-25

Mark J. Godin Y. Mandel P. (1969) Biosynthesis of aspartic, glutamic, gamma-aminobutyric acids and glutamine in brain of rats deprived of total sleep or paradoxical sleep. *J Neurochem.* 16 (8):1263-72

Marrion NV. (1997) Control of M-current. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 488–504

Martineau M. (2013) Gliotransmission: focus on exocytotic release of L glutamate and D-serine from astrocytes. *Biochem Soc Trans.* 41, 1557–1561

Martinez-Gonzalez C. Micklem BR. Bolam JP. Mena-Segovia, J. (2009) Neurons containing calciumbinding proteins are topographically organized in the pedunculopontine nucleus. *Neuroscience Meeting Planner.* Chicago, IL: Society for Neurosc. Online

Martinez-Gonzalez C. Bolam JP. Mena-Segovia J. (2011) Topographical organization of the pedunculopontine nucleus. *Front Neuroanat.* 5;5:22

Martinez-Gonzalez C. van Andel J. Bolam JP. Mena-Segovia J. (2014) Divergent motor projections from the pedunculopontine nucleus are differentially regulated in Parkinsonism. *Brain Struct Funct.* 219, 1451–1462

Martinez-Gonzalez C. Wang HL. Micklem BR. Bolam JP. Mena-Segovia J. (2012) Subpopulations of cholinergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the pedunculopontine nucleus contain calcium-binding proteins and are heterogeneously distributed. *Eur J of Neurosci.* Vol. 35:723–734

Mena-Segovia J. Bolam JP. (2017) Rethinking the pedunculopontine nucleus: from cellular organization to function. *Neuron* 94 (1):7-18

Mena-Segovia J. Winn P. Bolam JP. (2008a) Cholinergic modulation of midbrain dopaminergic systems. *Brain Res Rev* 58 (2):265–271

Mena-Segovia J. Micklem BR. Nair-Roberts RG. Ungless MA. Bolam JP. (2009) GABAergic neuron distribution in the pedunculopontine nucleus defines functional subterritories. *J Comp Neurol.* 515, 397–408

- Mena-Segovia J. Sims, HM. Magill PJ. Bolam JP. (2008b) Cholinergic brainstem neurons modulate cortical gamma activity during slow oscillations. *J Physiol.* 586, 2947–2960
- Mesulam MM. Mufson EJ. Levey AI. Wainer BH. (1984) Atlas of cholinergic neurons in the forebrain and upper brain stem of the macaque based on monoclonal choline acetyltransferase immunohistochemistry and acetylcholinesterase histochemistry. *Neurosci.* 12, 669-686
- Mieda M. Hasegawa E. Kisanuki YY. Sinton CM. Yanagisawa M. Sakurai T. (2011) Differential roles of orexin receptor-1 and -2 in the regulation of non-REM and REM sleep. *J Neurosci* 31 (17):6518-6526
- Mignot E. Lammers GJ. Ripley B. Okun M. Nevsimalova S. Overeem S. Vankova J. Black J. Harsh J. Bassetti C. Schrader H. Nishino S. (2002) The role of cerebrospinal fluid hypocretin measurement in the diagnosis of narcolepsy and other hypersomnias. *Arch Neurol.* 59(10):1553-62
- Miller MN. Okaty BW. Nelson SB. (2008) Region-specific spike-frequency acceleration in layer 5 pyramidal neurons mediated by Kv1 subunits. *J Neurosci* 28 (51):13716-26
- Moca VV. Nikolic D. Singer W. Mureşan RC. (2014) Membrane resonance enables stable and robust gamma oscillations. *Cerebral Cortex* 24 (1):119-42
- Monnerat-Cahli G. Alonso H. Gallego M. Alarcón ML. Bassani RA. Casis O. Medei E. (2014) Toll-like receptor 4 activation promotes cardiac arrhythmias by decreasing the transient outward potassium current (I_{to}) through an IRF3-dependent and MyD88-independent pathway. *J of Mol and Cell Cardiol.* 76:116-125
- Moore SD. Madamba SG. Schweitzer P. Siggins GR. (1994) Voltage-dependent effects of opioid peptides on hippocampal CA3 pyramidal neurons in vitro. *J. Neurosci.* 14:809–20
- Mori S. Nishimura H. Kurakam C. Yamamura T. Aoki M. (1978) Controlled locomotion in the mesencephalic cat: distribution of facilitatory and inhibitory regions within pontine tegmentum. *J Neurophysiol.* 41, 1580–1591
- Moruzzi G. Magoun HW. (1949) Brain stem reticular formation and activation of the electroencephalogram. *Electroencephalogr. Clin Neurophysiol.* 1, 455–473
- Motts SD. Schofield BR. (2009) Sources of cholinergic input to the inferior colliculus. *Neuroscience* 160, 103–114

- Nakamachi T. Endo S. Ohtaki H. Yin L. Kenji D. Kudo Y. Funahashi H. Matsuda K. Shioda S. (2005) Orexin-1 receptor expression after global ischemia in mice. *Regulatory Peptides* 126 (1-2):49-54
- Nie H. Zhang H. Weng HR. (2010) Bidirectional neuron-glia interactions triggered by deficiency of glutamate uptake at spinal sensory synapses. *J. Neurophysiol.* 104, 713–725
- Nigro MJ. Mateos-Aparicio P. Storm JF. (2014) Expression and functional roles of Kv7/KCNQ/M-channels in rat medial entorhinal cortex layer II stellate cells. *J Neurosci.* 34 (20):6807-12
- Oakman SA. Faris PL. Kerr PE. Cozzari C. Hartman BK. (1995) Distribution of pontomesencephalic cholinergic neurons projecting to substantia nigra differs significantly from those projecting to ventral tegmental area. *J Neurosci.* 15, 5859–5869
- Okubo Y. Iino M. (2011) Visualization of glutamate as a volume transmitter. *J Physiol.* 589(Pt 3), 481–448
- Orr AG. Hsiao EC. Wang MM. Ho K. Kim DH. Wang X. Guo W. Kang J. Yu GQ. Adame A. Devidze N. Dubal DB, Masliah E. Conklin BR. Mucke L. (2015) Astrocytic adenosine receptor A2A and Gs-coupled signaling regulate memory. *Nat Neurosci.* 18, 423–434
- Pál B. (2018) Involvement of extrasynaptic glutamate in physiological and pathophysiological changes of neuronal excitability. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75 (16): 2917-2949
- Pál B. (2015) Astrocytic actions on extrasynaptic neuronal currents. *Front Cell Neurosci.* 9:474
- Panatier A. Vallee J. Haber M. Murai KK. Lacaille JC. Robitaille R. (2011) Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell.* 146, 785–798
- Pankratov Y. Lalo U. Verkhratsky A. North RA. (2006) Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflugers Arch.* 452, 589–597
- Pape HC. Driesang RB. (1998) Ionic mechanisms of intrinsic oscillations in neurons of the basolateral amygdaloid complex. *J Neurophysiol.* 79 (1):217-226
- Papouin T. Ladépêche L. Ruel J. Sacchi S. Labasque M. Hanini M. Groc L. Pollegioni L. Mothet JP. Oliet SH. (2012) Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell.* 150, 633–646

- Papouin T. Oliet SH. (2014) Organization, control and function of extrasynaptic NMDA receptors. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 369:20130601
- Paré D. Smith Y. Parent A. Steriade, M. (1988) Projections of brainstem core cholinergic and non-cholinergic neurons of cat to intralaminar and reticular thalamic nuclei. *Neurosci.* 25, 69–86.
- Parpura V. Basarsky TA. Liu F. Jeftinija K. Jeftinija S. Haydon PG. (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369, 744–747
- Parpura V. Sekler I. Fern R. (2016) Plasmalemmal and mitochondrial Na^+ - Ca^{2+} exchange in neuroglia. *Glia.* 64 (10):1646-54
- Parri HR. Gould TM. Crunelli V. (2001) Spontaneous astrocytic Ca^{2+} oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat Neurosci.* 4, 803–812
- Paxinos G. Franklin KB. (2013) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, 4th edn. Elsevier, San Diego
- Pelluru D. Konadhode RR. Bhat NR. Shiromani PJ. (2016) Optogenetic stimulation of astrocytes in the posterior hypothalamus increases sleep at night in C57BL/6J mice. *Eur J Neurosci.* 43 (10):1298-306
- Perea G. Araque A. (2005) Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J Neurosci.* 25, 2192–2203
- Perea G. Yang A. Boyden ES. Sur M. (2014) Optogenetic astrocyte activation modulates response selectivity of the visual cortex neurons in vivo. *Nat Commun.* 5:3262
- Petralia RS. (2012) Distribution of extrasynaptic NMDA receptors on neurons. *Scientific World Journal* 2012:267120
- Petzold A. Valencia M. Pál, B. Mena-Segovia J. (2015) Decoding brain state transitions in the pedunculopontine nucleus: cooperative phasic and tonic mechanisms. *Front Neural Circuits* 9, 68
- Peyron C. Faraco J. Rogers W. Ripley B. Overeem S. Charnay Y. Nevsimalova S. Aldrich M. Reynolds D. Albin R. Li R. Hungs M. Pedrazzoli M. Padigaru M. Kucherlapati M. Fan J. Maki R. Lammers GJ. Bouras C. Kucherlapati R. Nishino S. Mignot E. (2000) A mutation in a case

of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med.* 6 (9):991-7

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

Poskanzer KE. Yuste R. (2016) Astrocytes regulate cortical state switching in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 113(19):E2675-84

Reese NB. Garcia-Rill E. Skinner RD. (1995) The pedunculopontine nucleus--auditory input, arousal and pathophysiology. *Prog Neurobiol;* 47 (2):105-33

Reyes-Haro D. Müller J. Boresch M. Pivneva T. Benedetti B. Scheller A. Nolte C. Kettenmann H. (2010) Neuron-astrocyte interactions in the medial nucleus of the trapezoid body. *J Gen Physiol.* 135, 583–594

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

Rusakov DA. Kullmann DM. (1998) Extrasynaptic glutamate diffusion in the hippocampus: ultrastructural constraints, uptake, and receptor activation. *J Neurosci.* 18, 3158–3170

Rye DB. Lee, HJ. Saper CB. Wainer BH. (1988) Medullary and spinal efferents of the pedunculopontine tegmental nucleus and adjacent mesopontine tegmentum in the rat. *J Comp Neurol.* 269, 315–341

Saitoh K. Hattori S. Song WJ. Isa T. Takakusaki K. (2003) Nigral GABAergic inhibition upon cholinergic neurons in the rat pedunculopontine tegmental nucleus. *Eur J Neurosci.* 18 (4):879–886

Sakurai T. (2007) The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nat Rev Neurosci.* 8 (3):171-81

Saper CB. Loewy AD. (1982). Projections of the pedunculopontine tegmental nucleus in the rat: evidence for additional extrapyramidal circuitry. *Brain Res.* 252, 367–372

Sasaki K. Suzuki M. Mieda M. Tsujino N. Roth B. Sakurai T. (2011) Pharmacogenetic modulation of orexin neurons alters sleep/wakefulness states in mice. *PLoS One.* 6 (5): e20360

- Sasaki T. Beppu K. Tanaka K. F. Fukazawa Y. Shigemoto R. Matsui K. (2012) Application of an optogenetic byway for perturbing neuronal activity via glial photostimulation. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 109, 20720–20725
- Shepherd G. M. (2004) *The Synaptic Organization of the Brain*. Oxford University
- Schuld A. Hebebrand J. Geller F. Pollmächer T. (2000) Increased body-mass index in patients with narcolepsy. *Lancet.* 355(9211):1274-5
- Selyanko AA. Delmas P. Hadley JK. Tatulian L. Wood IC. Mistry M. London B. Brown DA. (2002) Dominant-negative subunits reveal potassium channel families that contribute to M-like potassium currents. *J Neurosci.* 22, RC212; 1–5
- Shigetomi E, Bowser DN, Sofroniew MV, Khakh BS (2008) Two forms of astrocyte calcium excitability have distinct effects on NMDA receptor-mediated slow inward currents in pyramidal neurons. *J Neurosci* 28 (26): 6659-6663
- Shik ML. Severin FV. Orlovski, GN. (1966) Control of walking and running by means of electric stimulation of the midbrain. *Biofizika* 11, 659–666
- Shu Q. Hu ZL. Huang C. Yu XW. Fan H. Yang JW. Fang P. Ni L. Chen JG. Wang F. (2014) Orexin-A promotes cell migration in cultured rat astrocytes via Ca²⁺-dependent PKC α and ERK1/2 Signals. *PLOS.* 2014
- Shu Q. Zhang J. Ma W. Lei Y. Zhou D. (2017) Orexin-A promotes Glu uptake by OX1R/PKC α /ERK1/2/GLT-1 pathway in astrocytes and protects co-cultured astrocytes and neurons against apoptosis in anoxia/hypoglycemic injury in vitro. *Mol and Cell Biochem.* 425:103-112
- Sica R. E. (2015) Could astrocytes be the primary target of an offending agent causing the primary degenerative diseases of the human central nervous system? A hypothesis. *Med Hypotheses.* 84, 481–489
- Simon C. Kezunovic N. Ye M. Hyde J. Hayar A. Williams DK. Garcia-Rill E. (2010) Gamma band unit activity and population responses in the pedunculopontine nucleus. *J Neurophysiol* 104 (1):463-74
- Sims SM. Clapp LH. Walsh JV Jr, Singer JJ. (1990) Dual regulation of M current in gastric smooth muscle cells: beta-adrenergic-muscarinic antagonism. *Pflugers Arch.* 417 (3):291-302

- Skinner RD. Kinjo N. Ishikawa Y. Biedermann JA. Garcia-Rill, E. (1990) Locomotor projections from the pedunculopontine nucleus to the medioventral medulla. *Neuroreport*. 1, 207–210
- Smith Y. Paré D. Deschenes M. Parent A. Steriade M. (1988) Cholinergic and non-cholinergic projections from the upper brainstem core to the visual thalamus in the cat. *Exp Brain Res*. 70, 166–180
- Spann BM. Grofova I. (1989) Origin of ascending and spinal pathways from the nucleus tegmenti pedunculopontinus in the rat. *J Comp Neurol*. 283, 13–27
- Steriade M. Datta S. Paré D. Oakson G. Dossi C. (1990) Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems. *J Neurosci*. 10 (8):2541-2559
- Steriade M. Dossi, RC. Paré D. Oakson G. (1991) Fast oscillations (20–40 Hz) in thalamocortical systems and their potentiation by mesopontine cholinergic nuclei in the cat. *Proc Natl Acad Sci. USA* 88, 4396–4400
- Steriade M. Paré D. Parent A. Smith, Y. (1988) Projections of cholinergic and non-cholinergic neurons of the brainstem core to relay and associational thalamic nuclei in the cat and macaque monkey. *Neurosci*. 25, 47–67
- Sugaya K. McKinney M. (1994) Nitric oxide synthase gene expression in cholinergic neurons in the rat brain examined by combined immunocytochemistry and in situ hybridization histochemistry. *Brain Research Molecular Brain Research* 23 (1-2):111-125
- Suzuki R. Shimojima H. Funahashi H. Nakajo S. Yamada S. Guan JL. Tsurugano S. Uehara K. Takeyama Y. Kikuyama S. Shioda S. (2002) Orexin-1 receptor immunoreactivity in chemically identified target neurons in the rat hypothalamus. *Neurosci Lett*. 324 (1):5-8
- Takakusaki K. Shiroyama T. Kitai ST. (1997) Two types of cholinergic neurons in the rat tegmental pedunculopontine nucleus: electrophysiological and morphological characterization.
- Takakusaki K. Shiroyama T. Yamamoto T. Kitai ST. (1996) Cholinergic and noncholinergic tegmental pedunculopontine projection neurons in rats revealed by intracellular labeling. *J Comp Neurol* 371 (3):345–361

- Takakusaki K. Takahashi K. Saitoh K. Harada H. Okumura T. Kayama Y. Koyama Y. (2005) Orexinergic projections to the cat midbrain mediate alternation of emotional behavioural states from locomotion to cataplexy. *J Physiol.* 568 (Pt 3):1003-20
- Takakusaki K. Chiba R. Nozu T. Okumura T. (2016) Brainstem control of locomotion and muscle tone with special reference to the role of the mesopontine tegmentum and medullary reticulospinal systems. *J Neural Transm* 123, 695–729
- Lin L. Fraco J. Li R. Kadotani H. Rogers W. Lin X. de Jong Pj. Nishino S. Mignot E. (1999) The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell.* 6 98 (3):365-76
- Tian GF. Azmi H. Takano T. Xu Q. Peng W. Lin J. Oberheim N. Lou N. Wang X. Zielke HR. Kango J. Nedergaard N.(2005) An astrocytic basis of epilepsy. *Nat Med.* 11, 973–981
- Trivedi P. Yu H. MacNeil DJ. Van der Ploeg LH. Guan XM. (1998) Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett.* 438(1-2):71-5
- Tsujino N. Sakurai T. (2009) Orexin/hypocretin: a neuropeptide at the interface of sleep, energy homeostasis, and reward system. *Pharmacol Rev.* 61(2):162-76
- Tzingounis AV. Wadiche JI. (2007) Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. *Nat Rev Neurosci.* 8, 935–947
- Unal CT. Golowasch JP. Zaborszky L. (2012) Adult mouse basal forebrain harbors two distinct cholinergic populations defined by their electrophysiology. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 6 (21)
- Vanni-Mercier G. Sakai K. Lin JS. Jouvet M. (1989) Mapping of cholinceptive brainstem structures responsible for the generation of paradoxical sleep in the cat. *Arch Ital Biol.* 127, 133–164
- Veleanu M. Axen TA. Kristensen MP. Kohlmeier KA. (2016) Comparison of bNOS and chat immunohistochemistry in the laterodorsal tegmentum (LDT) and the pedunculopontine tegmentum (PPT) of the mouse from brain slices prepared for electrophysiology. *J Neurosci Methods* 263:23–35
- Verkhatsky A. Rodríguez JJ. Parpura V. (2012) Calcium signalling in astroglia. *Mol Cell Endocrinol.* 353, 45–56

- Volterra A. Meldolesi J. (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci.* 6, 626–640
- Vyklický L. Jr. (1993) Calcium-mediated modulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses in cultured rat hippocampal neurones. *J Physiol.* 470:575-600
- Wang HL. Morales M. (2009) Pedunculo-pontine and laterodorsal tegmental nuclei contain distinct populations of cholinergic, glutamatergic and GABAergic neurons in the rat. *Eur J Neurosci.* 29(2), 340–358
- Wang HS. Pan Z. Shi W. Brown BS. Wymore RS. Cohen IS. Dixon JE. McKinnon D. (1998) KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science.* 282:1890–1893
- Wilcox KS. Grant, SJ. Chgostophe GG. (1987) Electrophysiological properties of lateral dorsal tegmental neurons in vitro. *Neurosci Abstr.* 13, 57
- Willie JT. Chemelli RM. Sinton CM. Tokita S. Williams SC. Kisanuki YY. Marcus JN. Lee C. Elmquist JK. Kohlmeier KA. Leonard CS. Richardson JA. Hammer RE. Yanagisawa M. (2003) Distinct narcolepsy syndromes in Orexin receptor-2 and Orexin null mice: molecular genetic dissection of Non-REM and REM sleep regulatory processes. *Neuron.* 38(5):715-30
- Woolf, N. J. Butcher, L. L. (2011) Cholinergic systems mediate action from movement to higher consciousness. *Behav Brain Res.* 221(2):488-98
- Woolf NJ. Butcher LL. (1986) Cholinergic systems in the rat brain: III. Projections from the pontomesencephalic tegmentum to the thalamus, tectum, basal ganglia, and basal forebrain. *Brain Res Bull.* 16, 603–637
- Xi MC. Morales FR. Chase MH. (2001) Effects on sleep and wakefulness of the injection of hypocretin-1 (orexin-A) into the laterodorsal tegmental nucleus of the cat. *Brain Res.* 901(1-2):259-64
- Yamanaka A. Kunii K. Nambu T. Tsujino N. Sakai A. Matsuzaki I. Miwa Y. Goto K. Sakurai T. (2000) Orexin-induced food intake involves neuropeptide Y pathway. *Brain Res.* 859(2):404-9

Yamanaka A. Tsujino N. Funahashi H. Honda K. Guan JL. Wang QP. Tominaga M. Goto K. Shioda S. Sakurai T. (2002) Orexins activate histaminergic neurons via the orexin 2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 290(4):1237-45

Ye M. Hayar A. Strotman B. Garcia-Rill E. (2010) Cholinergic modulation of fast inhibitory and excitatory transmission to pedunclopontine thalamic projecting neurons. *J Neurophysiol.* 103 (5):2417-32

Yeomans JS. Lee J. Yeomans MH. Steidl S. Li L. (2006) Midbrain pathways for prepulse inhibition and startle activation in rat. *Neuroscience.* 142 (4):921-9

Zhou Y. Danbolt NC. (2013) GABA and glutamate transporters in brain. *Front Endocrinol.* 4:165

Zimmer ER. Torrez VR. Kalinine E. Augustin MC. Zenki KC. Almeida RF. Hansel G. Muller PA. Souza OD. Mchado-Viera R. Portela VR. (2015) Long-term NMDAR antagonism correlates reduced astrocytic glutamate uptake with anxiety-like phenotype. *Front Cell. Neurosci.* 9:219

11. TÁRGYSZAVAK

Nucleus pedunculopontinus, kolinerg neuron, akciós potenciál késési idő, A- áram, rostrocaudális grádiens, magas küszöbű membránpotenciál oszcilláció, neuromoduláció, orexin, lassú inward áramok, tónusos inward áramok.

Pedunculopontine nucleus, cholinergic neuron, spike delay, A-current, rostrocaudal gradient, high threshold oscillation, neuromodulation, orexin, slow inward current, tonic inward current.

12. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

Baksa B, Kovács A, Bayasgalan T, Szentesi P, Kőszeghy Á, Szücs P, Pál B. (2019) Characterization of functional subgroups among genetically identified cholinergic neurons in the pedunculopontine nucleus. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76 (14):2799-2815. D1, IF: 7,014

Kovács A, **Baksa B**, Bayasgalan T, Szentesi P, Csemer A, Pál B. (2019) Orexinergic actions modify occurrence of slow inward currents on neurons in the pedunculopontine nucleus. *Neuroreport*. 30(14):933-938. Q3, IF: 1, 3

13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni Prof. Csernoch László intézetigazgató úrnak, hogy lehetővé tette, hogy PhD hallgatóként részt vehettem az Élettani Intézet munkájában. Köszönettel tartozom Dr. Szücs Péternek, az Anatómiai Intézet igazgatójának, hogy kutatásom során számos kísérletben nyújtott segítséget. Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr Pál Balázsnak az elmúlt évek során nyújtott szakmai támogatásáért és dolgozatom megírásához nyújtott segítségéért. Köszönöm továbbá közvetlen munkatársaimnak, társszerzőimnek Dr. Szentesi Péternek, Dr. Kovács Adriennek Dr. Kőszeghy Áronnak, Dr. Tsogbadrakh Bayasgalannak és Csemer Andreának, a közös munkát és a segítséget, amit a laboratóriumban végzett munkám során nyújtottak. Végül szeretném megköszönni a támogatást páromnak, Dobi Lajosnak, aki biztosította a munkámhoz szükséges nyugodt hátteret.