

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Csemer Andrea

Témavezető: Dr. Pál Balázs Zoltán



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2024

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Csemer Andrea, okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori
iskolája
(élettan, neurobiológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Pál Balázs Zoltán, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Szántó Gábor Tibor, PhD

Dr. Gálosi Rita, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, akadémikus

tagok: Dr. Gálosi Rita, PhD

Dr. Frank Rita, PhD

Prof. Dr. Juhász Béla, PhD

Dr. Szántó Gábor Tibor, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme,
2024. június 13. 13 óra

Bevezetés

Az asztrociták

Az asztrociták számos agyi folyamatban részt vesznek, mint a neuronok metabolikus támogatása, a neuronok túlélésének, és differenciálódásának segítése és a szinaptogenezis, ion-, és vízhomeosztázis fenntartása, a neurotranszmitterek termelése és eltávolítása, valamint lebontása és a vér-agy gát kialakítása. Részt vesznek továbbá a különféle agyi funkciókban, ide értve a tanulást, memóriát, alvást és ébrenlétet, és a neuroendokrin szabályozást. Az asztrociták a nyúlványaikkal egy területet lefednek; ezt asztrocita doménnek nevezzük. Minden domén megközelítőleg 300-600 dendritet, és 10^5 szinapszist foglal magába, de humán asztrociták esetében ezen számok nagyságrendekkel nagyobbak lehetnek.

Attól függetlenül, hogy az asztrociták nem-excitábilis sejtek az intracelluláris kalcium pillanatnyi megemelkedésével az asztrociták kalcium hullámokkal vagy oszcillációval kommunikálnak a környező sejtekkel. A kalciumjel nem csak intracellulárisan, de intercellulárisan is jelként szolgálhat a sejtek között, azaz a kalciumjel tovább terjedhet egyik sejtről a másikra. Az asztrociták aktív szerepet töltenek be a központi idegrendszerben, a kalciumjelek mellett különböző neuroaktív anyagokat (glutamátot, ATP-t, tumor nekrozis faktor α -t (TNF α) és D-szerint) képesek felszabadítani.

Az asztrociták kifejeznek a membránjukon ionotróp és metabotróp glutamát receptorokat egyaránt, amelyek aktiválása az ic. Ca^{2+} koncentrációjának megnövekedésével jár. Az ionotróp receptorok közül

a 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il) propánsav (AMPA) és az N-metil-D-aszparaginsav (NMDA), míg a metabotróp receptorok körül a mGluR5 altípus a leggyakoribb, ami az IP₃ útvonalon keresztül szabadít fel kalciumot.

Az asztrociták nem csak a neuronok által kibocsátott glutamát felvételét és újrahasznosítását biztosítják, de maguk is képesek gliotranszmitterként glutamátot felszabadítani. Az asztrociták egyik fő feladata, hogy a szinaptikus résből kidiffundálódó glutamátot az extracelluláris térből transzportereken keresztül eltávolítsa. Ehhez specifikus glutamát transzportereket fejeznek ki a plazmamembránjukon. Az öt altípus közül a legnagyobb jelentőséggel az 1-es típusú excitatórikus aminosav transzporter (excitatory amino acid transporter 1- EAAT1) és a 2-es típusú excitatórikus aminosav transzporter (EAAT2) rendelkezik. A neuronális glutamát hatására az asztrocitákban a kalcium intracelluláris koncentrációja megnőtt. A kalciumjelre pedig az asztrocita maga is felszabadíthat glutamátot vezikulák révén, fordított transzporttal a glutamát transzporterén keresztül, sejtduzzadás következtében anioncsatornák megnyílásával, purinerg receptoron vagy hemichannel-eken keresztül, és cisztin-glutamát antiporter segítségével. A leggyakoribb glutamát felszabadítási forma a vezikulák útján történik.

A glutamát receptorok

Míg a glutamát koncentrációja a vezikulákon belül majdnem eléri a mol/l-es koncentrációt (~0.1mol/l) addig ez a szinaptikus résbe diffundálva már csak 6-7 mmol/l. Ez az extracelluláris térben tovább

diffundálva kb 0,18-2,12 $\mu\text{mol/l}$ -re (mérési módszertől függően nmol/l és $\mu\text{mol/l}$ -es koncentráció között) csökkenti a glutamát koncentrációját.

Az NMDA receptorok

Az NMDA receptorok ligandvezérelt, heteromer ioncsatornák, amiket a glutamát, és koaktivátorként a D-szerin és a glicin képes aktiválni. A ligand kötése után a csatorna permeabilissá válik nátriumra, káliumra és kalciumra. Fiziológiás körülmények között, önmagában a ligand kötése nem tudja a csatorna pórusát átjárhatóvá tenni, szükség van a membrán depolarizálódásához is. Az NMDA receptorok mindegyikét eltorlaszolja egy Mg^{2+} és a receptorok aktiválódásának egyik feltétele, hogy ez a blokádnak megszűnjön. A heteromer csatornákat GluN1, GluN2A-D, GluN3A-B alegységek formálják, di- vagy triheteromer formációban. A csatornák felépítésében mindig részt vesz egy GluN1 alegység, ami elengedhetetlen a csatorna működéséhez. A GluN2A alegység jellemzően a szinapszisokban lévő NMDA receptorok egyik összetevője, míg a GluN2B leginkább extraszinaptikusan helyezkedik el.

Az NMDA receptorok nem egyenletesen helyezkednek el a membránban, hanem klaszterekbe tömörülnek. Ezek a dendritek mentén és a periszinaptikus régiókban helyezkednek el.

A szinaptikus plaszticitás

A szinapszisok aktivitásának csökkenése vagy növekedése hatással van a szinaptikus válaszok erősségére. A szinaptikus transzmisszió ezen aktivitásfüggő változásait szinaptikus plaszticitásnak nevezzük. A mechanizmus időtartalmától függően elkülöníthetünk rövid és hosszú távú plaszticitást. A rövid távú plaszticitás az ezredmásodperctől akár

percig tartó változás, ami megnövelheti, vagy lecsökkentheti a neurotranszmitterek felszabadulásának valószínűségét. A hosszú távú plaszticitás a több órán át tartó változástól kezdve akár hónapokig vagy évekig is fennmaradhat.

A hosszú távú potencírozás (LTP)

A kísérletekben LTP-t több módon is ki lehet váltani: stimulációval, vagy kémiai úton. Rövid ideig tartó, de nagy frekvenciával (~100 Hz) való stimulálás (high frequency stimulation- HFS) megnövelte a szinaptikus potenciálok amplitúdóját. Kémiai úton az mGluR-ok és NMDAR-ok aktiválása egyaránt okozhat LTP-t. Az asztrociták glutamát felszabadítása következtében a preszinaptikus metabotróp glutamát receptorok és a preszinaptikus NMDA receptorok aktiválása révén a neurotranszmitterek felszabadulásának valószínűsége akár órákra megnőhet, vagy lecsökkenhet. Ahhoz, hogy ilyen sokáig fennmaradjon a potencírozás, szükség van a preszinaptikus mellett posztszinaptikus és asztrocita stimulációra is. Miközben a preszinaptikus és posztszinaptikus sejtek időben szinkronizálva aktiválódnak, a preszinaptikus sejt felszabadítja a glutamátot, miközben a posztszinaptikus sejt depolarizálódik, az NMDA receptorok felszabadulnak a magnézium blokádtól és megnyílnak. Az NMDA receptorok aktiválódása nyomán a posztszinaptikus sejtben megnő az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációja, ami elindít egy jelátviteli kaszkádot. A kaszkád végén további AMPA receptorok helyezkednek ki. Az NMDA receptorok összetétele, a vizsgált terület és az életkor is befolyásolja a az LTP-ket.

Hosszú távú depresszió (LTD)

A hosszú távú depresszió alacsony frekvenciás stimulációval (LFS) váltható ki, ahol 0,5 és 5 Hz közötti stimuláció 5-15 percen keresztül alkalmazása LTD-t vált ki. Ahogyan az LTP-nél, itt is lehet kémiai úton is kiváltani LTD-t, ehhez az mGluR-ok és/vagy az NMDA receptorok aktivációjára van szükség. Az LTD kialakulását illetően több elmélet is napvilágot látott. Egy elmélet szerint az mGluR-ok és NMDA receptorok aktivációja egyaránt kiválthat LTD-t, míg mások azt találták, hogy az mGluR-ok által kiváltott LTD-t képes elnyomni az NMDA-függő LTP, vagyis attól függ, hogy LTP vagy LTD formálódik, hogy melyik receptor aktiválódik. Egy másik elmélet szerint attól függ, hogy LTP vagy LTD alakul-e ki, hogy az NMDA receptorok milyen arányban nyílnak meg, és mekkora a Ca^{2+} koncentrációjának változása a posztszinaptikus sejtben. Ha a kalciumjel kicsi és elhúzódó, akkor LTD alakul ki, ha nagy és tranziens, akkor LTP. Az LTD-nél szintén fontos az NMDA receptorok összetétele: fiatal állatokban a GluN2B alegység dominál.

Az időzítésfüggő szinaptikus plaszticitás

McNaughton és mtsai az 1978-ban megjelent kutatásukban valószínűleg elsőként ismerték fel, hogy a pre- és posztszinaptikus akciós potenciálok (spikes- tüskék) időzítése és sorrendje egymáshoz képest befolyásolhatja a szinaptikus plaszticitást. A Hebb-féle klasszikus STDP-ben, ha a posztszinaptikus tüskét kb. 0-20 ms-al megelőzi a preszinaptikus aktivitás, akkor LTP alakul ki. Ha a posztszinaptikus tüske jön először, és utána a preszinaptikus, nagyjából 0 és 20-100 ms között, akkor LTD alakul ki. A corticalis sejtekben az időzítésfüggő LTP-hez (t-

LTP) a posztszinaptikus NMDA receptorok szükségesek, míg az időzítésfüggő LTD-hez (t-LTD) a preszinaptikusak.

A preszinaptikus sejtől felszabaduló transzmitterek aktiválják a posztszinaptikus sejt NMDA receptorait, ami megnyílik és Ca^{2+} áramlik a sejtbe. Az, hogy LTP vagy LTD alakul-e ki, a klasszikus formához hasonlóan a beáramlott Ca^{2+} mennyisége fogja meghatározni.

Az STDP nem hangolja össze a neuronokat, hanem egy kiegyensúlyozott, mégis irreguláris tüzelési állapothoz vezet, ahol a pre- és posztszinaptikus akciós potenciálok ok-okozati összefüggésben vannak. Az STDP az életkorral változhat. Míg fiatal rágcsálókban az t-LTD az első és második posztnatális héten jelen volt, felnőttkorra eltűnt, ellentétben az t-LTP-vel. Fiatal felnőtt (21-38 éves) emberekben is bizonyították mind a Hebb-féle, mind az anti-Hebb-féle STDP meglétét. Humán, 20-66 éves korú páciensekből gyűjtött műtéti hippocampus mintákban is megfigyelték már az STDP-t.

A lassú inward áramok

Elsőként Alfonso Araque és mtsai írták le a lassú inward áramok jelenségét (slow inward current- SIC), és már 1998-ban megállapították, hogy a SIC-ek kialakulásához szükség van kalciumjelre az asztrocitákban, illetve az asztrocitákból felszabaduló glutamátra. A SIC egyértelműen elkülöníthető a paramétereit és eredetét tekintve az EPSC-től. A SIC-ek amplitúdója ugyan hasonlíthat az EPSC-kére, de a rise time, vagyis a felszálló szár ideje és a decay tau, vagyis a leszálló szár időállandója egyértelműen különböző, tehát egymástól tökéletesen elkülöníthetőek. Amíg az EPSC neuronális események következménye,

addig a SIC kialakításában az asztrociták is kiveszik a részüket. Az asztrociták aktiválódását jelzi a Ca^{2+} koncentráció megemelkedése, amit következtében megnő a SIC-ek frekvenciája a környező neuronokon.

A neuronális szinaptikus események nem vesznek részt a SIC-ek kialakulásában, mivel az akciós potenciálokat gátolva is mérhetőek SIC-ek a neuronokon, vagyis TTX-re nem érzékenyek. Ebből következik, hogy a SIC-eket az asztrocita váltja ki valamilyen gliotranszmittert kibocsátva. Az asztrocitákból glutamát szabadul fel és a neuronális oldalon a glutamát hatására az extraszinaptikus NMDA receptorok aktiválódnak.

A SIC-eket már több agyterületen is megfigyelték, úgy mint hippocampus, thalamus, nucleus accumbens, bulbus olfactorius, visualis cortex, gerincvelő, a nucleus medialis corporis trapezoidei, és a nucleus pedunculopontinus. Az évek alatt több elmélet született a SIC-ek funkciójáról és szerepéről. Habár a SIC-eket széleskörűen vizsgálták és találtak bizonyítékot a meglétére, fiziológias szerepét még a mai napig is homály fedi.

A táplálékfelvétel és a nucleus arcuatus

Fiziológias körülmények között a nucleus arcuatus (ARC) szabályozza a táplálék- és energiafelvételt. A hypothalamus nucleus arcuatus magjában termelődnek és szekretálódnak az orexigén és anorexigén neuropeptidek. Az orexigén peptidek az Agouti-related protein (AGRP) és a neuropeptid Y (NPY), az anorexigének pedig a proopiomelanokortin (POMC) és a kokain és amfetamin-kapcsolt transzkriptum (CART). Az orexigén peptidek növelik a táplálék felvételt

és csökkentik az energiafelhasználást, míg az anorexigén peptidek fordítva viselkednek – csökkentik a táplálék felvételt és növelik az energiafelhasználást. Ezen neuropeptidek szintézise és szekréciója negatív feedback útján szabályozhatók, és ezen mechanizmusok felborulása anyagcsere-zavarokat és étkezési zavarokat okozhatnak. A táplálékfelvételt rövid- és hosszútávú szabályozással tartja megfelelő keretek között a szervezet. A rövidtávú szabályozás az étkezés elejére és végére korlátozódik, míg a hosszútávú az energia tárolását és fogyasztását befolyásolja.

Az astaxanthin

Az astaxanthin (3,30-dihidroxi-4,40-diketo-karotin, ASX) egy lipofil, tengeri xantofill karotinoid, amit tengeri algafajok termelnek, de termelik még baktériumok és élesztőgombák is. Ezeket apróbb rákok elfogyasztják. Azok a fajok, amik az astaxanthin tartalmú algákat, vagy rákokat elfogyasztják, maguk is rózsaszínű színezetet kapnak. A krill-olaj astaxanthin tartalma 0,1-1,5 mg/ml közé tehető. Az ASX hidrofób szerkezete lehetővé teszi, hogy az ASX könnyedén átdiffundálhat a sejtmembránon. Ez a képessége hozzásegíti, hogy nagyszerű védelmet nyújtson az oxidatív stressz ellen- a reaktív oxigén és a szabadgyökök ellen is egyaránt- a sejtmembrán mindkét oldalán. Az ASX-t étrendkiegészítőként emberi fogyasztásra is forgalmazzák az USA-ban, Japánban és az Európai Unióban.

Az ASX bevitele, mint étrendkiegészítő javította a véráramlást és jótékony hatással volt az eritrocitákra, de a kutatók biztató eredményeket találtak a gyulladáscsökkentő, immunstimuláló, antioxidáns, rákellenes

és antidiabetikus, szív- és érrendszeri, szem- és bőr, valamint neuroprotektív hatásairól. Az ASX lipofil jellege miatt képes átjutni a vér-agy gáton is, így sokat vizsgálták a hatását különböző neurodegeneratív betegségekben.

Célkitűzések

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

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

Anyagok és módszerek

Oldatok és vegyszerek

Kísérleteinkben általános pufferként, illetve a patch-clamp és kalcium-imaging mérésekhez arteficiális cerebroszpinális folyadékot használtunk. Az agyszeletek preparálásához módosított, alacsony nátrium tartalmú aCSF-t használtunk. Azokban a kísérletekben, ahol SIC-eket mértünk, magnéziummentes aCSF-et készítettünk.

Humán minták

A kísérletekben 13 betegből származó mintát vizsgáltunk. A betegek 38 és 74 év közötti nők (6) és férfiak (7) voltak. Mindegyik beteg valamilyen neocortexet érintő rosszindulatú daganatos betegségben szenvedett (5 glioblastoma multiform, 8 carcinoma metastasis). A szeletelési és mérési protokollok a humán és egér minták esetében azonosak voltak.

Állatok

A SIC-es kísérletsorozathoz 9-585 napos egereket használtunk mindkét nemből, amik közül voltak kontroll egerek (lox-tdTomato; $n = 71$), illetve amelyek gliafibrilláris savas fehérje (GFAP) függő módon expresszálták a tdTomato fluoreszcens fehérjét ($n = 12$). Fialat felnőtt (9-12 hetes állatok, mindkét nemből) lox-tdTomato egerekbe sztereotaxiás injekcióval használatra kész vírusokat juttattunk be, amelyek a hM3D(Gq) kemogenetikai aktivátort és a GFAP promóter alatt expresszált mCherry fluoreszcens markert kódoló plazmidokat hordoztak vagy kizárólag mCherry markert kontrollként. Az egereket ketamin (100 mg/kg) és xilazin (10 mg/kg) intraperitonealis injekciójával altattuk. A

fünt leírt vírusokból Hamilton fecskendővel és mikroinjektorral 100-100 nl-t injektáltunk a kéreg felszínére, valamint a parietális kéreg 200 és 400 μm mélységébe

Az astaxanthinos kísérletsorozatnál a krónikus, 4 hetes ASX-táplálási kísérletekben fiatal felnőtt (3 hónapos) vad típusú C57BL6 egereket ($n = 16$) használtunk (8-at ASX-kiegészítéssel ellátott táppal, 8-at pedig normál rágcsálótáppal etettünk). A speciális takarmányt 4 g/kg AstaReal A1010 (100%-os etanolban feloldva) hozzáadásával készítették a standard rágcsáló pellethez, aminek így a ASX végkoncentrációja 0,02%-os volt. Az akut kísérletekben a tdTomato fluoreszcens fehérjét proopiomelanocortin (POMC) vagy 2-es típusú glutamátdekarboxiláz (GAD2) függő módon expresszáló egereket ($n = 8$ mindkét csoportban), valamint a GCaMP6f genetikailag kódolt kalcium-indikátort a 2-es típusú vezikuláris gamma-amino-vajsav transzporter (VGAT2) függő módon expresszáló egereket ($n = 3$) használtunk mindkét nemből.

A minták preparálása

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

Elektrofiziológia

A III-IV. rétegben lévő neocorticalis piramis sejteken és a hypothalamus nucleus arcuatus magjának POMC- és GAD-pozitív sejtjein patch-clamp méréseket végeztünk. A patch-pipetták ellenállása

6-8 M Ω volt. A pipetta oldat tartalmazott 8 mmol/l biocitint. A whole cell patch clamp kísérleteket szobahőmérsékleten (24-26 °C) végeztük Axopatch 200A erősítővel. Minden adatot a Clampex 10.0 szoftverrel rögzítettünk, az adatelemzéshez pedig a Clampfit 10.0 és Synaptosoft MiniAnalysis szoftvereket használtuk.

Az áram-clamp kísérletekben 1 s hosszúságú, -30 pA-tól +120 pA-ig terjedő, 10 pA nagyságú áramlépcsőkkel áramimpulzusokat alkalmaztunk humán piramis neuronokon, hogy ellenőrizzük a neuronok életképességét. Az ASX kísérletsorozatunk esetében ugyanezt a protokollt használtuk az akciós potenciálok regisztrálásához. A nyugalmi membránpotenciált -60 mV-ra állítottuk be. A spontán tüzelési frekvencia rögzítése áram-clampben történt.

A SIC-ek, tónusos áramok, spontán EPSC-ek és IPSC-k mérésére szolgáló gap-free felvételeket -60 mV-os tartópotenciálon feszültség-clamp konfigurációban mértük. Az általunk kiváltott EPSC-eket szintén feszültség-clamp konfigurációban rögzítettük. Ezekben a kísérletekben a vizsgált neuront innerváló preszinaptikus rostokat egy volfrám bipoláris elektródával stimuláltuk, nagyjából 50-100 μ m-re a neuron szómájától. Az egyes ingereket 20 másodpercenként adtuk le.

A méréseket normál aCSF-ben és magnéziummentes aCSF-ben végeztük. Az NMDA receptorok alegység-összetételét vizsgáló kísérletekben 500 nmol/l PPPA-t (GluN2A-specifikus inhibitor), 5 μ mol/l ifenprodilt (GluN2B-specifikus inhibitor) és 10 μ mol/l D-AP5-öt (nem specifikus NMDAR inhibitor) használtunk. Más kísérletekben gátoltuk az EAAT1 és 2 glutamát transzporterek működését. Az EAAT1

specifikus gátlószerét, az UCPH101 10 és 25 $\mu\text{mol/l}$ -ben, az EAAT2 specifikus gátlószerét a WAY213613-t 10 és 100 $\mu\text{mol/l}$ -ben, míg a nem specifikus EAAT-gátló DL-TBOA-t 100 $\mu\text{mol/l}$ -ben használtuk.

Az elektromos stimulációt az asztrociták kemogenetikai aktiválásával kombináltuk. Ezekben a kísérletekben az egerekbe a fent leírt plazmidokat hordozó vírusvektorokat injektáltuk. A kontroll mérések után 10 $\mu\text{mol/l}$ clozapin-N-oxidot (CNO) használtunk. A kontrollkísérleteket naCSF-ben és 0,1%-os DMSO-ban végeztük (mivel a CNO törzsoldatot DMSO-ban oldottuk), valamint 1 $\mu\text{mol/l}$ sztrichninnel és 10 $\mu\text{mol/l}$ bicucullinnal egészítettük ki. Egy másik kísérleti elrendezésben 30 $\mu\text{mol/l}$ MNI-caged glutamátot adtunk a mérőkamrához és az egész kamrát Rapp villanólampa segítségével UV és UV közeli (395 nm alatti hullámhosszúságú) fénnel megvilágítottuk. A következő kísérletsorozatban a preszinaptikus elektromos ingerléssel együtt a SIC-et, mint feszültségparancsot alkalmaztuk. Ezt a SIC-et korábban egy egér neocorticalis piramis neuronján mértük.

Az astaxanthint (ASX) vizsgáló kísérletsorozatunkhoz 2,5 $\mu\text{mol/l}$ ASX-t oldottunk 0,1% etanol tartalmú nACSF-ben.

Kalcium-imaging

A kalcium-imaging mérésekhez VGAT2-GCaMP6 egerekből származó mintákat az elektrofiziológiai kísérleteknél leírtakkal megegyezően preparáltuk. A 344×260 pixel felbontású képkockákat 10 Hz-es képkockasebességgel készítettük.

Eredmények

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

Egér neocorticalis piramis sejteken feszültség-clamp üzemmódban gap-free felvételeket készítettünk. A kontroll felvételeket normál aCSF oldatban vettük fel, amit később magnéziummentes aCSF-re cseréltünk. Magnéziummentes környezetben nem csak a SIC-ek aktivitását növeltük, hanem az EPSC-k amplitúdója, rise time-ja és decay time-ja is megnövekedett, így az EPSC-k töltésáramlása is megnőtt. Erre előzetesen számítottunk. A SIC-ek amplitúdója, rise és decay time-ja és a töltésáramlása (SIC „területe”) is szignifikánsan nagyobb volt, mint az EPSC-k ugyanezen paraméterei. A rise time megfelelő küszöbértékként szolgált a SIC-ek és EPSC-k elkülönítésében, humán és egér minták esetében is ezt 20 ms-ban határoztuk meg.

A SIC-ek kialakulásában fontos szerepet játszó NMDA receptorok összetételét vizsgálva GluN2A, GluN2B alegység inhibitor, valamint nem szelektív NMDAR gátlót alkalmaztunk. A kísérletein során a kontrollhoz képest a SIC-aktivitás 500 nmol/l PPPA (GluN2A alegység gátló) hatására nem változott, viszont 5 μ mol/l ifenprodil (GluN2B alegység gátló) hatására a SIC aktivitása szignifikánsan, 10 μ mol/l D-AP5 (nem szelektív NMDAR-gátló) pedig teljesen megszüntette a SIC-eket.

Az asztrocitákat kemogenetikai úton aktiváltuk. A CNO hatására a SIC-ek aktivitása szignifikánsan megnőtt. Ezen változások nem voltak megfigyelhetőek a csak mCherry-t tartalmazó kontrollban.

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

Humán neocorticalis piramis sejteken feszültség clamp üzemmódban gap-free felvételeket készítettünk. A tartó potenciál -60 mV volt. A SIC-ek amplitúdója, rise és decay time-ja és a töltésáramlása (SIC „területe”) szignifikánsan nagyobb volt, mint az EPSC-k ugyanezen paraméterei, illetve itt is lassabb eseményről beszélhetünk, tehát humán mintákban is könnyedén megkülönböztethetőek voltak egymástól a SIC-ek és az EPSC-k.

Humán minták esetében is megvizsgáltuk az NMDA receptorok összetételét. A SIC aktivitást a kontrollhoz képest a GluN2B alegység gátlószere, 5 $\mu\text{mol/l}$ ifenprodil és az NMDAR nem specifikus gátlószere, 10 $\mu\text{mol/l}$ D-AP5 egyaránt szinte teljesen megszüntette. A kemo-vagy optogenetikai vizsgálatok helyettesítése céljából WAY2131613-at (EAAT2 specifikus glutamát-transzporter gátló) alkalmaztunk. 100 $\mu\text{mol/l}$ WAY szignifikánsan növelte a SIC-aktivitást humán sejtekben.

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

A spontán EPSC-k amplitúdóját és frekvenciáját hasonlítottuk össze az első SIC megjelenése előtt és után. Néhány esetben mind a frekvencia, mind az amplitúdó megnőtt, míg más mérések alkalmával csökkenést tapasztaltunk. Voltak olyan esetek, ahol nem tapasztaltunk változást.

A hm3D aktuátort expresszázó asztrocitákat az aktuátor ligandjával, CNO-val aktiváltuk. Ezzel egy időben a piramis sejtek excitatórikus szinaptikus bemenetét elektromosan stimuláltuk. Ha a SIC és az

elektromos stimulációval kiváltott EPSC csúcsa 1 másodpercen belül volt, megfigyeltük az EPSC amplitúdójának változását. Az esetek felében az EPSC-k amplitúdója hosszú távon megváltozott ($n = 18$). Ha SIC megelőzte a kiváltott EPSC csúcsát (negatív shift), vagy azzal egy időben történt (zero shift), az EPSC amplitúdó 21-137%-os növekedését tapasztaltuk. Amennyiben a SIC az EPSC-t követve alakult ki (pozitív shift), az EPSC-k amplitúdójában 22-33%-os csökkenést láttunk ($n=3$). Ezen változások a teljes mérési idő alatt fennmaradtak (40 perc).

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

Annak érdekében, hogy kizárhassuk más tényezők befolyását és bizonyosságot szerezzünk, hogy az asztrociták glutamát felszabadulása a változások okozója, villanófényes fotolízissel MNI-caged glutamátot szabadítottunk fel. A piramisajt excitatórikus bemenetét stimulálva EPSC-eket váltottunk ki és a villanófény általi glutamát felszabadulást a fentiekben leírtak szerint időzítettük. Az esetek több, mint felében (58%) megfigyelhető volt az EPSC-k hosszútávú változása ($n=17$). Ha a glutamát felszabadulás indukálta áram megelőzte az EPSC-t (negatív shift), vagy azzal egy időben jelent meg (zero shift), az amplitúdó 17-116%-kal megnőtt. Amikor a glutamát-indukált áram az EPSC után

jelent meg (pozitív shift), akkor az EPSC-k amplitúdója csökkent (21-26%). Az előző kísérlethez hasonlóan a SIC gyenge STDP-t váltott ki.

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

A SIC-ek hatása a szinaptikus plaszticitásra humán mintákban

A gap-free felvételeket az egér-kísérleteknél leírt kritériumok szerint végeztük, magnéziummentes oldatban. Azt találtuk, hogy az EPSC-k amplitúdója és frekvenciája az első SIC után megnőtt és időben hosszantartó változásnak bizonyult. Az EPSC amplitúdók az esetek 83%-ban 10-42%-os növekedést mutattak (n = 10). 66%-ban az EPSC- k frekvenciája is megnövekedett.

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

Szerettük volna megvizsgálni, hogy az öregedés hogyan befolyásolja a SIC-eket és azok hogyan hatnak a szinaptikus plaszticitásra. 9-547 napos egerek mérési adataiban vizsgáltuk a SIC-eket, ahol azt találtuk,

hogy a töltésáramlás nem változott az életkorral, viszont az amplitúdó, a rise time és decay time az életkorral együtt ingadozott. Ezek mellett egér mintákban a SIC-ek frekvenciája az életkorral szignifikánsan csökkent. A SIC-ek frekvenciája életkorfüggő módon szignifikánsan csökkent, és emiatt a SIC-ek aktivitása is mutatott némi csökkenést.

Az egereknél tapasztalt eredményekkel ellentétben a humán SIC-ek töltésáramlásában és aktivitásában drasztikus csökkenést tapasztaltunk az életkor előrehaladtával. A legérdekesebb különbség, hogy a humán mintáknál 70 év felett a SIC-ek teljesen eltűntek.

A két faj közötti különbségeket megfigyelve és a középkorú populációkat összevetve a humán mintákban a SIC-ek amplitúdója szignifikánsan kisebb volt, ellenben a decay time és a töltésáramlás szignifikánsan nagyobbak bizonyult. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a humán mintákban a SIC-ek lassabb kinetikával rendelkeztek.

A SIC aktivitás és a SIC-ek szinaptikus plaszticitást befolyásoló képességében bekövetkező változások részben a GluN2B alegység expressziójának megváltozásában keresendő. A középkorú és idős korcsoportba tartozó humán és egér mintákon elvégzett szinaptofizin, és GFAP-val kolokalizált GluN2B immunfestés során az idős korcsoportban a fluoreszcencia intenzitásának csökkenését tapasztaltuk.

Összefoglalván, egerekben az egyes SIC-ek paraméterei nem változnak az életkor előrehaladtával, de a humán mintákban a töltésáramlásban jelentős csökkenést figyelhettünk meg. Az egerekben az öregedés a SIC-ekre való reakcióképességet befolyásolta, míg humán mintákban a SIC aktivitása bizonyult korfüggőnek.

Az astaxanthin hypothalamusra gyakorolt hatása hosszútávú bevitel esetén

Először az excitabilitás változásait vizsgáltuk meg. A maximális akciós potenciál tüzelési frekvenciája szignifikánsan nagyobb volt a kontrollnál. Az átlagos tüzelési frekvencia szintén növekvő tendenciát mutatott az ASX-nal való etetés után.

A kísérlet következő lépéseként a spontán excitatorikus és inhibitorikus posztszinaptikus áramokat (EPSC és IPSC) vizsgáltuk meg. Az eredmények alapján elmondhatjuk, hogy az ASX nem változtatta meg az EPSC-k frekvenciáját és amplitúdóját. Érdekes módon az ASX-nal etetett populációban az IPSC frekvenciája szignifikánsan megnőtt, viszont az amplitúdó nem tért el a két csoportban.

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

Az astaxanthin akut hatása a hypothalamus neuronjain

Hasonlóan a hosszútávú etetési kísérlethez megvizsgáltuk az ASX akut kezelésének hatását a szinaptikus áramok változására. Az EPSC-k frekvenciája és amplitúdója nem változott, viszont az IPSC-k frekvenciája az ASX kezelés hatására megnőtt, de nem volt szignifikáns.

Ezt a kísérletsorozatot folytatva az ASX GABAerg neuronokra és szinapszisokra gyakorolt hatását vizsgáltuk. VGAT2 promotor alatt GCaMP6f kalciumindukátort expresszáló sejteket felhasználva összesen 22 olyan ROI-t találtunk, ami kalcium tranzienseket mutatott. Az ASX akut alkalmazása a ROI-k 77,3%-ában megnövelte a kalcium-tranziensek

gyakoriságát, vagy kiváltotta a tranzienseket. 9,1 %-ban nem befolyásolta a sejtek aktivitását, és a maradék 13,6%-ban csökkentette, vagy megszüntette a kalcium-tranzienseket. Ehhez kapcsolódóan a kisebb fluoreszcens foltok (valószínűleg a GABAerg neuronok axon terminálisai) is hasonló választ adtak ASX alkalmazásakor. Az átlagos kalcium-tranziens frekvenciája $2,42 \pm 0,78$ Hz volt, ami ASX alkalmazásának hatására $3,73 \pm 0,75$ Hz-re nőtt (ez összességében $3,27 \pm 1,57$ szerez növekedés).

A GABAerg neuronok spontán akciós potenciál tüzelési sebessége $0,57 \pm 0,13$ Hz volt, ami ASX hatására $1,12 \pm 0,24$ Hz-re nőtt. Az szinaptikus áramokat és azok változásait is elemeztük, és nem találtunk szignifikáns különbséget a GABAerg neuronok EPSC-frekvencia és amplitúdó változásában.

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

Megbeszélés

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

A human és az egér SIC-ek különböznek

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

humán mintákban a SIC-ek amplitúdóját kisebbnek, de a kinetikai paraméterek egyértelműen faji különbözőséget mutattak.

A SIC-ek szinaptikus erősséget befolyásoló képessége

Az időzítésfüggő szinaptikus plaszticitás (spike timing-dependent plasticity-STDP) a hosszútávú plaszticitás egy széleskörűen vizsgált folyamata, ahol a kísérleti protokoll szerint a preszinaptikus bemenetet és a posztzinaptikus akciós potenciálokat időben összepárosítva váltják ki és ezt időben többször (10-300 alkalommal) alkalmazzák. A fiatal rágszálók hippocampusát és az emberi temporalis cortexet összehasonlítva, a humán mintákban fordított kapcsolatot találtak a preszinaptikus ingerlés és a posztzinaptikus tüskék időzítése és időbeli csúszása között. Amikor a posztzinaptikus tüskék megelőzték a preszinaptikus jelet, akkor LTP alakult ki, míg LTD esetében ez fordítva történt. Az LTP és LTD kialakulásának körülményeit szabályozó tényezők hátterében valószínűleg az intracelluláris kalcium jelek állhatnak, pontosabban azok időbeli hossza és időzítése más eseményekhez képest. Az, hogy az ic. kalcium hogyan változik több mechanizmustól függ: befolyással van rá a metabotróp glutamát és az NMDA receptorok aktivitása, valamint a feszültségvezérelt kalcium csatornák működése. A gliasejtek funkciójának gátlásával együtt a hosszú távú szinaptikus plaszticitás is megváltozhat. A gliasejtek kémiai úton történő gátlása befolyással lehet a hosszútávú szinaptikus plaszticitásra, tehát a gliasejtek (azon belül az asztrociták) fontos szerepet játszanak a szinaptikus plaszticitás kialakításában.

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

Ezen munkában bebizonyítottuk, hogy a SIC-ek nagyjából a szinapszisok felében képesek STDP-t kiváltani, amik megfelelnek az anti-Hebb szabálynak. Valószínűleg az eredményeink azért nem követik a klasszikus, Hebb-féle szabályokat (vagyis amikor a preszinaptikus ingerlés megelőzi a posztzinaptikus akciós potenciált, akkor LTP alakul ki), mert az általunk használt protokoll sem a hagyományos protokollok közé tartozik. A posztzinaptikus sejtekben az NMDA-receptorokon és feszültségfüggő csatornákon keresztül beáramló kalcium és az így megnövekedett intracelluláris kalcium koncentrációja nagy valószínűséggel hatalmas szereppel bír az STDP-k kialakulásában. Éppen ezért úgy gondoljuk, hogy a preszinaptikus stimulációval egy időben érkező SIC az intracelluláris kalcium szintjének megnövekedésével jár, ami LTP kialakulásához vezethet, amennyiben a SIC megelőzi, vagy egyszerre jelenik meg az EPSC-vel. Amikor az SIC-ek a kiváltott EPSC után alakultak ki, valószínűleg csak egy kezdeti kisebb és lassabban formálódó kalciumszint emelkedés történik az STDP időablakában. Ez az enyhe emelkedés a kalcium koncentrációban LTD-hez vezetnek.

A humán mintákon végzett kísérleteink alapján felmerül a gondolat, hogy a SIC-ek emberekben is képesek szinaptikus plaszticitást kiváltani. A humán SIC-eknek nagyobb a töltésáramlása, de lassabb a kinetikája, ami hatással lehet a szinaptikus plaszticitást szabályozó szerepükre, mivel időben hosszabb és lassabb növekedést okoznak a szomatodendritikus intracelluláris kalcium koncentrációban.

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

Az asztrociták számos morfológiai és funkcionális változáson mennek keresztül az öregedésük során. Egerek és főemlősök hippocampusában az asztrociták elágazásainak hossza és a végződésük komplexitása fiatal korban nő, felnőtt korban eléri maximumát, majd idős korban csökken. Az asztrociták elágazásainak térben elfoglalt mérete csökken, így az asztrociták doménje is csökken az életkorral.

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

Nagyrészt megerősítettük az irodalomban az egér öregedésről közölt, eddig megjelenő korábbi adatokat, miszerint az egyedi SIC-eket nem befolyásolja az öregedés, és habár a SIC-ek rágszálókban nem tűntek el az életkorral, de a frekvencia csökkent. Emberek esetében viszont a SIC-

ek paraméterei nem követi az egerekben találtakat. A töltésáramlás és a kinetikai paraméterek jelentősen csökkentek a humán mintákban és a SIC-aktivitás 70 éves kor felett teljesen megszűnt. Ennek egyik oka lehet az asztrociták glutamáttal kapcsolatos életkorfüggő változásai. A glutamát felvétel, illetve a glutamát felszabadítása, továbbá a neuronok extraszinaptikus NMDA receptorok expressziójának, funkciójának és összetételének megváltozása mind felelősek lehetnek a SIC-ek eltűnéséért.

A szinaptikus plaszticitásra eltérő hatással voltak a SIC-ek a két faj esetében. Egerekben a szinaptikus plaszticitást életkorfüggő módon befolyásolják a SIC-ek. Ennek több lehetséges oka is lehet, például az mGluR5 jelátvitelének csökkenése, vagy az NMDA-receptorok életkorfüggő változásai. Humán minták esetében viszont nem csak a szinaptikus plaszticitás, de maga a SIC is érintett. Ebben több tényező is közrejátszhat, mint például hogy az életkorral változik az asztrociták glutamát felvétele, vagy felszabadítása, valamint a neuronális NMDA-receptorok összetételének életkorfüggő változása. Kimutattuk, hogy a GluN2B alegység sűrűsége enyhén, de szignifikánsan csökkent, ami hatással lehet a szinaptikus plaszticitás SIC-ekre, illetve azok aktivitására való érzékenységére.

Az astaxanthin hatása a hypothalamus neuronjaira

A hypothalamus részeként a nucleus arcuatus fontos szerepet játszik a táplálékfelvételben. Az itt megtalálható két fő neuroncsoport ellentétesen szabályozzák az étvágyat és a táplálék felvételét: Az anorexigén típushoz tartozó POMC sejtek csökkentik, míg az orexigén csoporthoz tartozó

NPY és az AgRP- pozitív sejtek fokozzák a táplálék-felvételt. A szervezet aktuális energetikai állapotától függően a GABAerg bemenetek képesek befolyásolni a POMC sejtek működését. A GABAerg gátló bemenetek a hypothalamus dorsomediális részéről érkeznek és az orexigén AgRP sejtekből. A POMC neuronokat beidegző rostokon a spontán IPSC-k gyakorisága kalóriadeficit során megnő.

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

Összefoglalás

Ezen értekezés során szerettük volna megvizsgálni a SIC-ek eredetét, illetve paramétereiben található különbségeket egér és humán corticalis mintákban. A SIC-ek humán és egér mintákban is elkülöníthetők az EPSC-ktől, a SIC-ek amplitúdója, rise time-ja, decay time-ja és töltésáramlása is szignifikánsan nagyobb volt, mint az EPSC-k ugyanezen paramétere, mindkét faj esetében. Az irodalmi adatoknak megfelelően a GluN2B alegységet tartalmazó extraszinaptikus NMDA receptorok szükségesek a SIC-ek kialakulásához. Az asztrociták aktivitásának és glutamát-felszabadításának szerepét a SIC-ek kialakulásában kemogenetikai aktuátor segítségével vizsgáltuk egerekben. A hm3D aktuátor segítségével és annak asztrocita-specifikus aktivációjával a SIC-ek aktivitása szignifikáns növekedést mutatott a kontrollhoz képest. A humán minták esetében (kemogenetikai vizsgálatok lehetőségének hiányában) a glutamát felszabadulás modellezésére WAY213613-at alkalmaztunk az EAAT2 glutamát transzporter gátlásához. A kontrollhoz képest a WAY szignifikánsan megemelte a SIC-ek aktivitását. A SIC-ek szinaptikus plaszticitás befolyásolását vizsgáló kísérleteinkben azt találtuk, hogy a SIC-eket a kiváltott EPSC-khez képest időzítve a SIC-ek időzítésfüggően képesek voltak a szinaptikus plaszticitást hosszútávon befolyásolni. A SIC-ek és az öregedés összefüggését vizsgálva azt találtuk, hogy az egér és humán minták között nagyobb különbségek vannak. Míg az egereknél a SIC-ek töltésáramlása az életkorral nem változik, addig az aktivitásuk szignifikánsan csökkent. Ezzel szemben humán mintáknál a SIC aktivitás

mellett a töltésáramlás is csökkent, sőt 70 éves kor felett teljesen eltűnt. Ezek mellett az életkor befolyásolta a SIC-ek szinaptikus plaszticitásra gyakorolt hatásának erősségét.

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



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

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

A PhD értekezés alapján szolgáló közlemények

1. **Csemer, A.**, Kovács, A., Maamrah, B., Pocsai, K., Korpás, K. L., Klekner, Á., Szűcs, P., Nánási, P. P., Pál, B.: Astrocyte- and NMDA receptor-dependent slow inward currents differently contribute to synaptic plasticity in an age-dependent manner in mouse and human neocortex. *Aging Cell.* 22 (9), e13939, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/ace1.13939>
IF: 7.8 (2022)
2. Gönczi, M.*, **Csemer, A.***, Szabó, L., Sztretye, M., Fodor, J., Pocsai, K., Szenthe, K., Keller-Pintér, A., Köhler, Z. M., Nánási, P. P., Szentandrassy, N., Pál, B., Csernoch, L.: Astaxanthin Exerts Anabolic Effects via Pleiotropic Modulation of the Excitable Tissue. *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2), 917, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23020917>
* Megosztott első szerzős közlemény.
IF: 5.6

További közlemények

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





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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 28,788

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

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

Debrecen, 2023.12.05.

