

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**Az endokannabinoid és kolinerg neuromodulációs
mechanizmusok vizsgálata az egér nucleus pedunculopontinus
neuronjain és asztrocitáin**

Kovács Adrienn

Témavezető: Dr. Pál Balázs Zoltán



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2015

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

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

Írta: **Kovács Adrienn** okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Élettan és Neurobiológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Pál Balázs Zoltán, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora

tagok: Dr. Gálosi Rita, PhD

Dr. Varga Zoltán, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Élettani intézet Könyvtár
2015. november 30. 10:30 óra

Az értekezés bírálói: Dr. Kisvárday Zoltán, az MTA doktora
Dr. Kalló Imre, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora

tagok: Dr. Kisvárday Zoltán, az MTA doktora

Dr. Gálosi Rita, PhD

Dr. Kalló Imre, PhD

Dr. Varga Zoltán, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2015. november 30. 13 óra

Bevezetés

A nucleus pedunculopontinus (PPN) morfológiai és funkcionális sajátosságai

A PPN a pontomesencephalicus tegmentumban található, és anatómiai elhelyezkedését tekintve caudalisan a nucleus parabrachialis, mediálisan a pedunculus cerebellaris superior, laterálisan a lemniscus lateralis, dorsalisan pedig a substantia nigra, nucleus cuneiformis és subcuneiformis határolja. A PPN kolinerg és nem-kolinerg (GABAerg, glutamaterg) neuronokból épül fel.

A PPN kolinerg neuronjai hosszú elágazó axonokkal rendelkeznek, melyek az agy számos részével képeznek kapcsolatot, így tehát a PPN számos leszálló és felszálló projekcióval rendelkezik, és kapcsolatban áll számos agyterülettel a központi idegrendszerben. A PPN felszálló projekciói közé a thalamusba, colliculus superiorba, a substantia nigrába, a nucleus subthalamicusba, a lateralis hypothalamusba, a zona incertába, a globus pallidusba, a nucleus entopeduncularisba, a bazális előagyba és a frontális kéregbe küldött rostok tartoznak. A PPN leszálló projekciói közé tartozik a periaqueductalis szürkeállomány, a nucleus reticularis, nucleus raphe dorsalis, nucleus raphe intermedius, nucleus raphe magnus, és a ventralis tegmentalis area.

Kimutatták, hogy a kolinerg neuronok képesek több transzmittert koexpresszálni, mint a glutamát, GABA, nitrogén-monoxid, valamint neuropeptideket mint a P-anyag. A PPN sejtjeire jellemző membrán receptorokat is vizsgálták, melyek közül leírták az NMDA (N-metil-d-aszpartát), az M2, M3 és M4-es muszkarin típusú receptorokat mind a PPN, mind pedig az LDT neuronjain. A szerotoninergerg 5HT2-es, hisztaminerg, GABAerg, valamint a noradrenerg receptorokat is kimutatták a kolinerg neuronokon.

A PPN fő funkciói közé sorolható a mozgásszabályozás, ezen kívül az alvás-ébrenlét fázisának szabályozása, és a startle reflex prepulzus gátlásában való részvétel. A magnak szerepe van szenzoros, motoros és kognitív funkciók kialakításában. A PPN érintettségét számos kórélettani folyamatban is kimutatták. Akár a PPN teljes pusztulása, akár a neuronok számának a csökkenése összefüggésben állhat bizonyos neurológiai, neuropszichiátriai megbetegedésekkel, mint pl. peduncularis hallucinózis, skizofrénia vagy vizuális hallucinációkkal járó Parkinson-kór. A Parkinson-kór terápiájaként végzett végzett mély agyi stimuláció egyik lehetséges célpontjaként is felmerült a PPN.

A kannabinoid és kolinerg jelátvitel a nucleus pedunculopontinusban

A PPN-ben mind a neuronok, mind az asztrociták reagálnak kannabinoid-1 (CB1) receptor-, valamint muszkarin típusú acetilkolin receptor agonistákra. Bár a *Cannabis sativa* származékának (azon belül is a legjobban ismert Δ^9 -tetrahidrokannabinolnak) a pszichoaktív hatása ősidők óta ismert, viszonylag újonnan fedezték fel azon receptorokat, amin keresztül ez a hatóanyag kifejti a hatását. Az első ilyen receptor (ami a CB1 nevet kapta), a kilencvenes évek elejére került leírásra. Még később került felismerésre, hogy ezt a receptort endogén ligandok is képesek aktiválni, amely molekulák az endokannabinoidok néven váltak ismertté (szemben az exogén kannabinoidokkal, a kannabisz származékaival. Számos ilyen lipidtermészetű vegyületet azonosítottak; elsőként az anandamidot. A prototípusos anandamid mellett számos más endokannabinoid is létezik, mint pl. a 2-arachidonoil-glicerol (2-AG), az oleamid, a virodhamin, a noladin éter vagy az N-arachidonildopamin.

Az endokannabinoidoknak a CB1 receptoron kívül további receptorai is ismertek. Elsősorban, de nem kizárólag perifériás lokalizációban (tipikusan az immunrendszerben) található meg a CB2 receptor valamint több, ún. nem CB1, és nem CB2 receptor. Ide tartozik a GPR55 és a GPR119. A fenti receptorokon kívül azonban az endokannabinoidok képesek direkt módon aktiválni más receptorokat és membránfehérjéket is (mint pl. a TRPV1 receptor, az 5-HT₃ receptor, a nACh receptor, az NMDA receptor, opioid receptorok, a T-típusú kalciumcsatorna, a TASK-1 csatorna vagy feszültségfüggő nátriumcsatorna. A CB1 receptor stimuláció legrégebben megismert és legrészletesebben jellemzett hatása az adenilát cikláz gátlása. Az endokannabinoid szignalizáció komplex voltát mutatja azonban, hogy az ellenkezőjét, a cAMP szint emelkedését is leírták. Emellett a CB1 receptor stimuláció a MAP kinázt (mitogén-aktivált protein kináz) is képes aktiválni. Ismert továbbá, hogy CB1 receptor stimuláció IP₃-érzékeny raktárakból képes Ca^{2+} -ot mobilizálni és ezáltal emelni az intracelluláris kalciumkoncentrációt. Az endokannabinoidok direkt módon és CB1 receptor függő úton is képesek ioncsatornákat modulálni. A P/Q-, N- és L-típusú kalciumcsatornákat gátolja a CB1 receptor aktiváció. A receptor több káliumcsatorna nyitását képes stimulálni, ugyanakkor a D-típusú és M-típusú káliumáramokat gátolja.

Preszinaptikus CB1 receptorok

Az utóbbi másfél évtizedben számos tanulmány támasztotta alá, hogy a neuronális elemek CB1 receptorai zömmel preszinaptikus lokalizációban fordulnak elő, és a szinaptikus neurotranszmissziót befolyásoló rövid, valamint hosszú távú hatásaik jól ismertek. Az endokannabinoidok által megvalósuló retrográd szignalizáció a rövid távú szinaptikus szabályozást a gátló és serkentő szinapszisok depolarizáció által indukált szuppresszióján keresztül valósítja meg. A gátló szinapszisok depolarizáció által indukált szuppressziója ("depolarization-induced suppression of inhibition", DSI), valamint a serkentő szinapszisokon érvényesülő ugyanezen hatás ("depolarization-induced suppression of excitation", DSE) a retrográd neurotranszmisszió által triggerelt rövid távú szinaptikus plaszticitásnak a példája. A posztzinaptikus neuron depolarizációja (vagy mGluR aktiváció) endokannabinoid-felszabaduláshoz vezet, ami a preszinaptikus CB1 receptorhoz kötődik, és ott G-protein függő módon feszültségfüggő kalciumcsatornákat gátol; ezáltal mérsékelve a neurotranszmitter-felszabadulást. A rövid távú plaszticitás mellett a hosszú távú plaszticitásban is szerepet kapnak az endokannabinoidok és a CB1 receptor; az endokannabinoid-mediált hosszú távú depressziót kialakítva. Itt elsősorban az adenilát cikláz gátlásán és a cAMP csökkenésén keresztül jön létre a hatás. A eCB-LTD input-specifikus volta is ismert, a preszinaptikus CB1 receptor aktiváció mellett a szinapszis aktív volta is szükséges a hatás létrejöttéhez.

A neuronális elemeken preszinaptikus lokalizációban előforduló CB1 receptorokon túl ismert, hogy az asztrociták is rendelkeznek ezzel a receptortípussal. Az asztrociták CB1 receptorának aktiválása effektíven képes neuronális funkciókat is befolyásolni. Leírásra került, hogy a hippocampalis piramissejtek depolarizációja során felszabaduló endokannabinoidok aktiválják az asztrociták CB1 receptorait, amelyek kalciumhullámokat produkálnak és glutamátot szabadítanak fel. Ez a glutamát képes egyrészt extraszinaptikus NMDA receptorok aktiválásán keresztül lassú befelé irányuló áramokat (slow inward current, SIC) létrehozni a szomszédos piramissejteken, másrészt preszinaptikus metabotróp glutamát receptorokon (mGluR) potenciózni a serkentő neurotranszmissziót. A rövid távú hatásokon túl az asztrociták CB1 receptorának aktivációja képes LTD-t indukálni a neocortexben.

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

Az asztrociták fiziológiája

Az asztrociták elektromosan nem excitábilisak, melynek egyik oka az, hogy nem rendelkeznek olyan denzitásban feszültségfüggő ioncsatornákkal, mint a neuronok. Az asztrociták membránjában is találhatóak kálium- és nátriumcsatornák, viszont ezeken a sejteken nem alakul ki akciós potenciál. Másrészt viszont, az asztrociták képesek mind spontánul, mind stimuláció hatására az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációjukat megváltoztatni, amit szokás "kalcium excitabilitásnak" is nevezni. Az asztrocitákra jellemző Ca^{2+} oszcillációkat, már számos helyen kimutatták, például a ventrobasalis thalamus, hippocampus, cerebellum és a neocortex területén.

A Ca^{2+} jelátvitel mechanizmusa különbözik az excitábilis sejtekben (például neuronokban, izomsejtekben) ill. a nem-excitábilis sejtekben (endotélsejtek, limfociták). Az excitábilis sejtekben a citoplazmatikus Ca^{2+} jel kialakulásakor, a Ca^{2+} belépés egyaránt származhat a feszültség/ligandfüggő Ca^{2+} csatornákból, valamint az intracelluláris raktárakból. A nem-excitábilis sejtekben, a Ca^{2+} felszabadulás a belső raktárakból valósul meg. Az asztrociták számos típusú kalciumjelet képesek produkálni attól függően, hogy a sejt nyúlványait, szómáját vagy az egész sejtet érintik; továbbá hogy továbbterjednek-e a környező asztrocitákra. A kalciumjelek kialakulását az asztrociták számos metabotróp receptorának aktivációja váltja ki, ami inozitol 1,4,5-trifoszfát (IP3) képződéséhez és az intracelluláris kalciumraktárakból történő IP3-indukált kalciumfelszabaduláshoz vezet. A kalciumjelek blokkolhatóak a SERCA pumpa gátlásával (pl. thapsigarginnal) vagy az IP3 receptor gátlásával intracellulárisan alkalmazott heparinnal. Az IP3 és a kalcium diffúziója gap junction-okon keresztül asztrociták között terjedő kalciumhullámokat képes kialakítani; a gap junction gátlása megakadályozza a kalciumjel továbbterjedését.

A gliotranszmitterek a gliasejtekben termelődnek, felszabadulásukat pedig fiziológiai vagy patofiziológiai mechanizmusok szabályozzák. A gliotranszmittereket 3 fő csoportba soroljuk. Az első csoportba az aminosavak (pl.: glutamát, D-szerin), a másodikba a nukleotidok (pl.: ATP), a harmadik csoportba pedig a peptidek tartoznak (pl.: atriális natriuretikus peptid, BDNF).

Az asztrociták a szinaptikus neurotranszmisszió szabályozásában a neuronok aktív partnerei. Szemben a szinapszisok klasszikus leírásával, ahol a résztvevő két partner a pre- és a poszt-szinaptikus neuron ("bipartite synapse"), a szinapszisokhoz közeli asztrociták - harmadik partnerként- specifikusan reagálnak neurotranszmitterekre és gliotranszmitterek révén maguk is befolyásolják a szinaptikus neurotranszmissziót ("tripartite synapse"). A neuron-asztrocita kommunikáció fontos voltát jelzi, hogy az asztrocitákon megtalálhatóak

neurotranszmitter receptorok. Az asztrociták nagyszámú (elsősorban metabotróp) receptort expresszálnak, számos neurotranszmitter számára (pl.: glutamát, adenosin, norepinephrin, GABA, hisztamin, acetilkolin stb.). Az asztrociták receptorainak aktivációja kalciumhullámok létrejöttéhez vezet, és ennek következtében számos gliotranszmitter szabadulhat fel, mint például a glutamát, GABA, acetyl-kolin, noradrenalin, nitrogén-monoxid.

Célkitűzések

Kísérletes tevékenységem céljai az alábbiak:

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

Anyagok és módszerek

Oldatok

A funkcionális mérésekhez, az általunk készített mesterséges agy-gerincvelői folyadékot (aCSF) használtunk. A preparálás során egy módosított, alacsony nátriumtartalmú aCSF-et (low Na aCSF) használtunk.

Egyes funkcionális mérések során a normál aCSF extracelluláris oldatot lecseréltük glutamaterg, glicinerg, és GABAerg neurotranszmissziót blokkoló oldatra. A glutamaterg ingerületáttevődést NBQX és D-AP5 alkalmazásával, a glicinerg neurotranszmissziót sztrichninnel, a GABAerg szinapszisokat pedig bikukullinnal blokkoltuk.

A kalciumkoncentráció-mérések az Oregon Green 488 BAPTA-1 fluoreszcens kalciumindikátor-festék (OGB) acetoxi-metilészter (AM) formájának alkalmazásával történt.

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

Kísérleti állatok

Kísérleteinkhez 8-15 nap közötti C3H egereket használtunk, továbbá tdTomato fluoreszcens fehérjét expresszáló GAD2 illetve ChAT egereket mindkét nemből. Számos esetben használtunk fel kísérleteinkhez CB1 receptor knockout egereket illetve vad típusú alomtársaikat.

Túlélő agyszelet preparálása

Miután dekapitáltuk az állatot, eltávolítottuk az agyat, majd pedig vibratóm segítségével 200 μ m-es koronális középagyi szeletet vágunk, melynek preparálása mindvégig alacsony nátrium tartalmú aCSF-ben történt. A szeleteket végül nACSF-fel feltöltött kamrában, 37°C-on inkubáltuk 1 órán keresztül, majd pedig szobahőmérsékletűre hűtöttük. Az inkubációs oldatot karbogén gázkeverékkel (95% O₂; 5% CO₂) buborékoltattuk, ezzel biztosítva az oldat megfelelő O₂ tartalmát és pH-ját.

Elektrofiziológia

A mérések során az agyszeleteket 40x-es nagyítású vízimmerziós objektívvel és Nomarski optikával felszerelt, Zeiss Axioskop mikroszkóp használatával tettük láthatóvá. A mérés alatt a szeleteket karbogénnel buborékoltatott, nACSF-fel áramoltattuk át. A mikroelektrodákat boroszilikát üvegapillárisból, vertikális húzóval készítettük. A mérésekhez 5 M Ω ellenállású patch pipettákat készítettünk, melyet belső oldattal töltöttük meg. A teljes sejtes patch clamp vizsgálatokhoz Axopatch 200A erősítőt használtunk. Az összes mérés szobahőmérsékleten lett elvégezve. Patch-clamp technika teljes sejtes elrendezésében, áram-clamp üzemmódban, külső ingerlés nélkül, folyamatosan mértük a neuronok membránpotenciálját. Az elemzéshez két, 120 s hosszúságú mérési szakasz került kiválasztásra: az egyik szakaszt a kontroll periódusból, a másikat pedig a szer hozzáadását követő 3 perc utáni időszakból választottuk ki. A membránpotenciál e periódusainak értékeiből hisztogramokat készítettünk, és azt a feszültségértéket tekintettük a nyugalmi membránpotenciálnak, amelyikhez a legtöbb adatpont tartozott. Hiperpolarizációnak vagy depolarizációnak a 2 mV-ot meghaladó membránpotenciál-változásokat tekintettük, mert a

hasonló körülmények között, de szerek alkalmazása nélkül megfigyelt membránpotenciál-változások átlagos értéke $2 \pm 0,52$ mV volt. Ehhez hasonlóan, az akcióspotenciál-tüzelési frekvencia spontán fluktuációja $0,52 \pm 0,19$ Hz-nek bizonyult; és ennek alapján a 0,5 Hz feletti értékeket tekintettük a tüzelési frekvencia változásának.

Alkamazott szerek

CB1 receptor agonistaként ACEA-t alkalmaztunk 5 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban és WIN55,212-2-t 1 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban használtuk. Az UCM707-et (anandamid membrán transzport inhibitor) 10 $\mu\text{mol/l}$ -es koncentrációban alkalmaztuk. Bizonyos kísérletekben a szeleteket folyamatosan perfundáltuk 10 $\mu\text{mol/l}$ (NBQX), 50 $\mu\text{mol/l}$ DAP5, 1 $\mu\text{mol/l}$ sztrichninnel, valamint 10 $\mu\text{mol/l}$ bikukullinnal, hogy blokkoljuk az ionotróp glutamát-, glicin- és GABA-receptorokat. A további kísérletekben 100 $\mu\text{mol/l}$ CPCCOEt és 10 $\mu\text{mol/l}$ MPEP-et alkalmaztunk az 1-es és 5-ös típusú metabotróp glutamát receptorok (mGluR I-es csoport) blokkolására, míg az mGluR II-es csoportba tartozó receptorok blokkolására 10 $\mu\text{mol/l}$ LY341495 használtunk. A spontán akcióspotenciál-tüzelést 1 $\mu\text{mol/l}$ TTX-el blokkoltuk. Más kísérletekben, a szeleteket 50 nmol/l ACEA-val 5-7 percig előinkubáltuk, mielőtt az 5 $\mu\text{mol/l}$ ACEA-t alkalmaztuk. A muszkarinos agonista karbakolt 50 $\mu\text{mol/l}$ -es koncentrációban használtuk.

Intracelluláris Ca^{2+} koncentráció mérése

Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció méréshez, „calcium imaging” technikát használtunk. Kísérletünk során OGB-AM-et tartalmazó festékekkel inkubáltuk be a szeleteket. Ennek során a szeleteket egy nACSF-et tartalmazó Millicell CM sejtenyésző edénykébe illeszthető kamrába helyeztük. Ezt követően a szeleteket előinkubáltuk OGB-vel, a sejtek festékekkel való megtöltődésének céljából. Az inkubálás alatt a sejtek felvették a Ca^{2+} érzékeny festéket. A szeleteket Zeiss Axioskop mikroszkóppal tettük láthatóvá. A szeleteket a mérés során nACSF-fel folyamatosan perfundáltuk. A mikroszkóp egy olyan fluoreszcens képalkotó rendszerrel volt felszerelve, amely lehetővé tette a fluoreszcens jelek detektálását és a fluoreszcencia intenzitás időbeli változásának rögzítését. A fluoreszcens festék gerjesztése 488 nm hullámhosszúságú fénnel történt.

Ezzel párhuzamosan patch-clamp kísérleteket is végeztünk. Annak érdekében, hogy bizonyítsuk a lassú kalcium hullámok glia eredetét, teljes-sejt patch-clamp méréseket is végeztünk mind áram-, mind feszültség-clamp üzemmódban. Ezeket a sejteket Alexa Fluor

594 fluoreszcens festékkel is megtöltöttük a morfológiai azonosítás érdekében. Továbbá, loose-patch üzemmódban vezettünk el a lassú kalciumhullámokat produkáló sejtekről, hogy bizonyítsuk, hogy a lassú hullámok nem kapcsolódnak akcióspotenciál-tüzeléshez. Bizonyos kísérletekben, a metszeteket előinkubáltuk thapsigarginnal 45 percen keresztül, hogy gátoljuk az asztrociták kalcium hullámait. A fluoreszcens kalciumkoncentrációk eredményét képsorozatok formájában exportáltuk a Till Vision nevű programból. A képsorozatok kiértékelése az egyedi sejtek azonosításával és kijelölésével kezdődött („region of interest”/ROI). A következő lépésben számszerűsítettük a ROI-k átlagos fluoreszcenciaintenzitásainak változását.

A jelölt neuron láthatóvá tétele

Az elektrofiziológiai mérések során a neuronok biocitinnel lettek megtöltve. A szeleteket ezt követően paraformaldehiddel foszfát-pufferben 4°C-on fixáltuk egy éjszakán át. A permeabilizálást Tris-pufferolt sóoldattal sikerült elérni, amely 0,1% Triton X-100-al és 10% szarvasmarha-szérummal volt kiegészítve. A szeleteket ezt követően streptavidin-konjugált Alexa 488-at tartalmazó foszfát-pufferben inkubáltuk 90 percig. Azokban a mintákban, melyekben nem volt tdTomato expresszió, azokon kolin acetiltranszferáz (ChAT) immunhisztokémiát végeztünk el. A sejteket Zeiss LSM 510 konfokális mikroszkóppal tettük láthatóvá.

Immunhisztokémia

Kísérleteink során három egeret használtunk a tdTomato-t ChAT függő módon expresszáló törzsből, illetve három egeret a C3H vad típusú egerekből. Az állatokat nátrium pentobarbitállal túlaltattuk, majd pedig Tyrode oldatot áramoltattunk át az állaton transzkardiális perfúzió segítségével; melyet a fixálás céljából lecseréltünk 4%-os paraformaldehidre. A fixálást követően a mesencephalont eltávolítottuk, majd utófixáltuk 4 órán keresztül, utána pedig 10 és 20%-os szukróz oldatot tartalmazó 0,1 M-os PB oldatba helyeztük, míg le nem süllyedt. Annak érdekében, hogy fokozzuk a penetrációt, az eltávolított mesencephalont lefagyasztottuk. Ezt követően 50 µm-es vastagságú vékony transzverziális szeleteket vágunk vibratóm segítségével, majd pedig a szeleteket átmostuk PB-vel.

Az **egyszeres immunhisztokémiai** protokoll alkalmas a CB1 receptor eloszlásának tanulmányozására a PPN-ben. A kísérlet során, a szabadon úszó szeleteket előinkubáltuk nyúl anti-CB1 antitesttel 48 órán át 4°C-on, majd ezt követően nyúl ellen termeltetett IgG Alexa Fluor 647-tel konjugált antitestet adtunk hozzá. Mielőtt az antitest kezelés megtörtént volna,

azelőtt 10%-os normál kecskeszérumban tartottuk 50 percen keresztül. Az ellenanyagokat TBS-ben hígítottuk, amely 1%-os normál kecskeszérumot is tartalmazott. Végül a szeleteket tárgylemezre helyeztük és Vectashielddel lefedtük.

Kettős immunhisztokémiai jelölés során, a CB1 receptor és az asztrociták jellegzetes markerének a GFAP-nek a kolokalizációját tanulmányoztuk. A szabadon úszó szeleteket először egy kevert antitestet, nyúl anti-CB1 receptort és egér anti-GFAP-t tartalmazó oldattal inkubáltuk. A szeletek elsődleges antitesttel történő beinkubálása, 2 napon keresztül 4°C-on történt, majd pedig a másodlagos antitestek, a nyúl ellen termeltetett kecske IgG Alexa Fluor 647 konjugált antitest, valamint az egér ellen termeltetett kecske IgG Alexa Fluor 488 konjugált antitest 1 éjszakán keresztül inkubálódtak a szeleteken. Mielőtt a szeletek megkapták az antitest kezelést, előinkubáltuk őket 50 percen keresztül 10%-os normál kecskeszérummal. Az antitesteket PBS-ben hígítottunk, amely 1%-os normál kecskeszérumot is tartalmazott. Végül a szeleteket tárgylemezre helyeztük és Vectashielddel lefedtük.

Az 1 μm optikai vastagságú szeleteket konfokális mikroszkóppal szkenneltük. A beolvasott képek elemzéséhez Adobe Photoshop CS6 szoftvert használtunk.

Az elsődleges antitest, a CB1 receptorral szembeni antitest specificitásának megerősítése érdekében előzetesen CB1 knockout egereken is elvégezték a kísérletet. A specificitás ellenőrzésére a szabadon úszó szeletekre a protokoll szerint alkalmaztak antitestet. Más esetekben vad típusú mintát alkalmazva az antitestet lecserélték 1%-os normál kecskeszérumra. Egyik esetben sem volt megfigyelhető CB1 immunpozitivitás.

A kvantitatív analízis céljából elvégeztük a CB1 receptor és GFAP receptor immunpozitivitásának a vizsgálatát, melynek során a szabadon úszó szeleteket nyúl anti-CB1 receptor-, kecske anti-ChAT-, és egér anti-GFAP- antitesttel inkubáltuk. A szeleteket az elsődleges antitesttel 2 napon keresztül 4°C-on kezeltük, melyet azt követően lecseréltünk másodlagos antitestre, méghozzá számár anti-nyúl IgG Alexa Fluor 555 konjugált, kecske ellen termeltetett számár IgG Alexa Fluor 488 konjugált, és egér ellen termeltetett számár IgG Alexa Fluor 647 konjugált antitestre.

A CB1 receptor és az asztrocita-marker kolokalizáció vizsgálatát több festett metszeten elemeztük. A CB1 receptor vizsgálatakor több szabványos rács került kiválasztásra és vizsgáltuk az axonok, illetve a gliasejtek markereit.

Statisztikai analízis

Minden adatot átlag $\pm$ standard hiba (SEM) formájában tüntettünk fel. Két független adathalmaz központi tendenciáinak (átlag, vagy medián) összehasonlítására t-próbát vagy Mann–Whitney féle U próbát használtunk. Amikor a karbakolra és ACEA-ra bekövetkező membránpotenciál- és tüzelésifrekvencia- változásokat hasonlítottuk össze, a neuronokat a válaszaik (depolarizáció, hiperpolarizáció, válaszhány) szerint csoportosítottuk 2 mV-os küszöbértéket használva; és Fisher-féle próbát használtuk a p értékek Bonferroni korrekciójával. A szignifikancia küszöbének a $p = 0,05$ -ös értéket tekintettük. A számítások elvégzésére SigmaPlot 12 és GraphPad Prism 6 programot használtunk. A karbakolra és az ACEA-ra kialakuló membránpotenciál változások elemzéséhez és feltüntetéséhez az OriginPro 8-as szoftvert használtuk.

Eredmények

A CB1 receptor aktivációja heterogén választ váltott ki a PPN neuronjaiból

Teljes sejtes elrendezésben, áram-clamp üzemmódban végzett patch-clamp méréseink során a CB1 receptor stimulációjának hatását vizsgáltuk a PPN neuronjainak membránpotenciáljára és tüzelési mintázatára. A sejtek elhelyezkedésének és morfológiájának azonosításához biocitin jelölést használtunk. Egyes esetekben ChAT és GAD65 függő módon tdTomato fluoreszcens fehérjét expresszáló idegsejteken végeztünk méréseket. A neuronok 54%-ánál spontán akciós potenciál tüzelés volt megfigyelhető, melynek átlagos frekvenciája $1,85 \pm 0,35$ Hz volt. A sejtek 5 $\mu\text{mol/l}$ ACEA hatására különböző módon reagáltak: egyesek depolarizálódtak és megnövelték az akcióspotenciál-tüzelési frekvenciájukat, mások pedig hiperpolarizálódtak és csökkent a tüzelési frekvenciájuk vagy teljesen meg is szűnt a spontán aktivitásuk. Ezen kívül voltak olyan sejtek, amelyek nem reagáltak ACEA-ra. A CB1 receptor deficiens egerek neuronjain csak nagyon kis mértékű, a vad típusú mintákon mért változásoknál szignifikánsan kisebb membránpotenciál- és tüzelési frekvencia változásokat láttunk. Egy másik kannabinoid receptor agonista, a WIN55,212-2, és az anandamid membrán transzporter inhibitor UCM707 is hasonló hatásokat váltott ki.

A további kísérletek során megvizsgáltuk, hogy a megfigyelt heterogén membránpotenciál-változások háttérében milyen receptorok, hatások állnak. A megfigyelt heterogén válasz potenciálisan függhet az adott neuron típusától. A különbségek vizsgálata céljából mértünk tdTomato-t kifejező kolinerg és GABAerg neuronokon is. Mindkét sejtcsoport esetében ugyanúgy háromféle választ tapasztaltunk ACEA hatására. A kolinerg sejtek azonos arányban depolarizálódtak, hiperpolarizálódtak vagy pedig nem reagáltak ACEA hatására, a GABAerg neuronok esetében viszont a sejtek főként depolarizálódtak. A továbbiakban arra kerestünk választ, hogy a neuronális aktivitás blokkolása befolyásolja-e a CB1 receptor stimulációra látott válaszokat, azaz a neuronális hálózaton érvényesülő hatást vagy közvetlen poszt/extraszinaptikus hatást látunk. TTX alkalmazásakor vagy a gyors szinaptikus neurotranszmisszió gátlásakor használt koktél alkalmazásakor nem tapasztaltunk változást az ACEA által kiváltott membránpotenciál-változásban. A következő kísérletsorozatban a szeleteket az I-es vagy a II-es csoportú metabotróp glutamát receptorok (mGluR) antagonistáival kezeltük. Az mGluR I blokkolókkal kezelt neuronok depolarizálódtak vagy pedig nem reagáltak ACEA hatására, de mGluR II-es blokkoló hatására az ACEA néhány esetben hiperpolarizációt okozott, de a depolarizáció gyakorlatilag elmaradt. A gyors szinaptikus neurotranszmissziót blokkoló koktélt és az mGluR I-es és II-es antagonistákat együtt alkalmazva az ACEA nem eredményezett szignifikáns változást a nyugalmi potenciálban és tüzelési frekvenciában.

A CB1 receptor aktivációja megváltoztatja az asztrociták Ca^{2+} hullám frekvenciáját

Mivel a gyors szinaptikus ingerületátvitel és akciós potenciális tüzelés gátlása nem szüntette meg a kannabinoid-indukált neuronális membránpotenciál változást; megvizsgáltuk, hogy az asztrociták CB1 receptoron keresztüli aktivációja, hatással van-e a neuronális aktivitásra. A szeleteket OGB kalciumérzékeny festékkel inkubáltuk, és mértük a fluoreszcenciaintenzitás-változást. A sejtek morfológiájának meghatározásához Alexa 594 fluoreszcens festékkel töltöttük meg a sejteket. Az akciós potenciálokat nem tüzelő, passzív membránsajátságokkal és asztrocitákra jellemző morfológiával rendelkező sejtek spontán lassú kalciumhullámokat produkáltak, amelyek TTX jelenlétében is kimutathatók voltak, viszont eltűntek thapsigargin alkalmazása során.

Az ezt követő kísérletekben, a neuronális és gliális aktivitást egyszerre követtük nyomon: az OGB-vel előinkubált szeletben current-clamp konfigurációban mértünk egy neuronon, illetve ezzel párhuzamosan a neuron szómájának 50 μm -es környezetében, 5-21

töltött sejten mértük a kalciumhullámok frekvenciaváltozásait. A neuronon kialakuló 2 mV-ot meghaladó depolarizációt a kalciumhullámok frekvencianövekedése előzte meg és követte a környező asztrocitákon. A környező asztrocitákban ezekben az esetekben a kezdeti kis frekvenciájú spontán tevékenység ACEA alkalmazását követően a kétszeresére emelkedett körülbelül 4 percen át, majd fokozatosan visszatért az eredeti értékre. A hiperpolarizálódó neuronok közelében elhelyezkedő asztrociták viszont ACEA hatására folyamatos kalciumhullám-frekvencianövekedést mutattak. Az ACEA alkalmazására nem reagáló neuronok körüli asztrociták a szer alkalmazása előtt is magas kalciumhullám-frekvenciát mutattak, ami nem változott szignifikánsan a CB1 receptor agonista alkalmazása alatt sem.

A neuronális membránpotenciál változásokért az asztrociták CB1 receptorainak aktivációja felelős

A CB1 receptorok jelenlétét a PPN asztrocitáiban immunhisztokémiai módszerrel bizonyítottuk, ahol a CB1 receptor és az asztrociták specifikus markerének, a GFAP-nak a kolokalizációját mutattuk ki. Azt találtuk, hogy a GFAP-pozitív nyúlványok a CB1 receptor immunpozitivitással kolokalizálódnak, azaz az asztrociták egy jelentős része CB1 immunpozitivitást mutatott. Annak érdekében, hogy funkcionális bizonyítékot találjunk arra, hogy a CB1 receptor agonisták az asztrocitákon elhelyezkedő CB1 receptorokat aktiválja, megismételtük a kísérletet CB1 knockout egereken is, kombinált Ca^{2+} -imaging és patch-clamp méréseket alkalmazva. Összehasonlítva a vad típusú állatok mérési adataival, az asztrociták spontán kalciumhullámai lényegesen alacsonyabb frekvenciát mutattak kontroll körülmények között a CB1 knockout egerek esetében.

Az asztrocitákon megfigyelt változások annak is lehetnek a következményei, hogy a neuronális aktivitás változása miatt azok is megváltoztatják az aktivitásukat. Ennek a lehetőségnek a megvizsgálására vad típusú egereken alkalmaztuk TTX-et annak érdekében, hogy gátoljuk a neuronális akcióspotenciál-tüzelést. Az ACEA alkalmazását megelőzően, TTX jelenlétében szignifikánsan alacsonyabb volt az asztrociták kalciumhullám-frekvenciája, mint a kontroll körülmények között. Azonban amikor ACEA-t alkalmaztunk, szignifikánsan megnövekedett a kalciumhullám-frekvencia TTX jelenlétében.

Ez után azt vizsgáltuk, hogy az asztrociták gátlása megakadályozza-e a neuronok CB1 receptor agonisták hatására kialakuló membránpotenciál változását. Ehhez a vad típusú egerekből származó szeleteket 45 percig thapsigarginnal inkubáltuk, amely kiürítette az intracelluláris kalciumraktárakat, majd az ezt követő 10 percen belül végeztünk méréseket.

Mint az várható volt, miután thapsigarginnal előinkubáltuk a szeleteket, nem tapasztaltunk lassú kalciumhullámokat. Ezzel párhuzamosan, az ACEA-ra bekövetkező neuronális membránpotenciál- és tüzelési frekvencia-változások is elhanyagolhatóak voltak; az előinkubálás nélküli választól szignifikánsan különböztek. A neuronális válasz hiánya nem a neuronok thapsigarginnal való gátlásának a következménye volt, mivel a glutamát alkalmazása depolarizációt és tüzelésifrekvencia-növekedést eredményezett.

A kolinerg és endokannabinoid stimuláció hatása nagyrészt megegyezik a PPN neuronjain

Kísérleteink további részében arra a kérdésre kerestünk választ, hogy a kolinerg neuromoduláció hatásai mennyire fednek át a korábban megfigyelt kannabinoid hatással. 22 PPN neuronon végeztünk méréseket patch-clamp technika teljes-sejtes elrendezésében, áram-clamp üzemmódban. Mind a kolinerg, mind pedig a nem-kolinerg neuronok esetében, karbakol hatására heterogén választ figyeltünk meg, ami depolarizációból, hiperpolarizációból és válaszhiányból állt. A heterogén válasz karbakol hatására nem tér el lényegesen a korábbi méréseinkben alkalmazott ACEA hatásától.

A következőkben azt vizsgáltuk, hogy a kolinerg és kannabinoid stimulációra adott válaszok ugyanazon neuronon megegyeznek-e, vagy az individuális neuronok különbözően reagálnak-e az egyes szerekre. Ennek meghatározásához, teljes-sejtes patch-clamp kísérletet végeztünk áram-clamp üzemmódban PPN neuronon, ahol először a karbakolt alkalmaztuk, majd miután megfelelően kimostuk a karbakolt, CB1 receptor agonista ACEA-t mostunk be.

Hét esetben a karbakol depolarizációt váltott ki. Ezeken a neuronokon az ACEA alkalmazása ugyancsak depolarizációt váltott ki. Négy esetben a karbakol nem okozott semmilyen változást; ezeken a sejteken az ACEA alkalmazása sem eredményezett változást. Öt neuronon hiperpolarizációt váltott ki a karbakol. Ezeken a sejteken, az ACEA alkalmazása nem mutatott olyan szoros összefüggést a karbakol hatásával, mint az előző esetekben: egy esetben depolarizációt, egy esetben válaszhiányt, és 3 sejten hiperpolarizációt tapasztaltunk ACEA hatására.

Megbeszélés

Az asztrociták CB1 receptorának aktivációja modulálja a PPN neuronjainak tevékenységét

Széles körben elfogadott az a tény, hogy az asztrociták hatékonyan képesek neuronális funkciókat befolyásolni. Számos neurotranszmitter receptorról rendelkeznek, amelyeken keresztül aktiválódva nagyszámú gliotranszmitter szabadulhat fel, mint a glutamát, ATP, adenozin, TNF α , D-serin és peptidek. Az egyik legalaposabban vizsgált gliotranszmitter a glutamát, amely az asztrocitákból többféle módon szabadulhat fel: a kalciumfüggő exocitózis mellett, a plazmamembrán glutamát transzporterek reverz működésén keresztül, de cisztein-glutamát antiporttal, connexin/pannexin "hemichannel"-eken keresztül, ionotrop purinerg receptorokon keresztül, szerves anion transzportereken és sejtduzzadás által nyitott anioncsatornákon keresztül történő glutamátfelszabadulásról is beszámoltak.

Számos tanulmány kimutatta, hogy mind asztrocita sejt kultúrában, mind pedig az agy bizonyos területein levő asztrociták rendelkeznek CB1 receptorról, melyek kannabinoidok által aktiválva képesek az asztrocitákon kalciumhullámokat aktiválni. A CB1 receptorok mellett a funkcionális CB2 receptorok ugyancsak kimutathatóak az asztrocitákon, de a receptor jelentősége az általunk megfigyelt hatásokban nem valószínű.

Az asztrocita aktiváció glutamátfelszabaduláshoz vezet, ami potencírozhatja a glutamaterg szinapszisokat vagy hosszú távú depressziót indukálhat NMDA receptorokon vagy a preszinaptikus mGluR-okon keresztül. Kimutattuk, hogy a neuronok aktiválása az asztrociták zömmel CB1 receptoron keresztüli aktiválásához vezet. Az aktivált asztrociták feltehetően vagy felszabadítanak glutamátot, vagy mérséklék glutamátfelvő tevékenységüket, így a szöveti glutamát mennyiségét megemelik. Ez a glutamát metabotróp glutamátreceptorokon keresztül fejti ki az általunk megfigyelt neuronális hatást.

Az mGluR-ok szerepe a neuron-glia jelátvitelben

A kísérleteink során használt mGluR I és mGluR II gátlószerek alkalmazásával megmutattuk, hogy a neuronális hiperpolarizáció mGluR I aktivációján keresztül megy végbe, míg a depolarizáció mGluR II függő. Újabb tanulmányok demonstrálták az I-es és II-es típusú mGluR-ok funkcióját és jelenlétét középgygi régiókban, valamint hogy az asztrociták aktivációja preszinaptikus mGluR-ok aktivációjához vezet, és szerepük van a hosszú távú potencírozás folyamatában a hippocampus területén. Mindezek mellett, tudomásom szerint a

jelen munka az első arra vonatkozó bizonyíték, hogy tónusos neuronális aktiváció vagy gátlás megy végbe egy középagy területén attól függően, hogy milyen típusú mGluR aktiválódott.

Az mGluR-ok széles körben jelen vannak a központi idegrendszer területén mind pre-, mind posztszinaptikus lokalizációban. Számosan tanulmány leírta az I-es és II-es csoportba tartozó mGluR-ok jelenlétét asztrocitákon, melyek képesek reagálni az extracelluláris glutamát koncentráció változásaira. A glutamát és az mGluR I és II agonisták a hippocampális asztrocitákon kalciumhullámokat keltenek, amely "glutamát-indukált glutamát felszabadulást" vált ki. Számos megfigyelés igazolta, hogy a posztszinaptikus mGluR I és II aktiváció neuronális membránpotenciál változásokhoz vezetett. Az mGluR I aktiváció során neuronokban végbemenő depolarizáció egyrészt L-típusú kalciumcsatornákon keresztül valósul meg, másrészt nem-szelektív kationcsatornákon keresztül megy végbe. Az mGluR II aktivációja vagy az L-típusú kalciumcsatornákat gátlásán, vagy a kálium csatornákat aktivációján keresztül fejti ki hatását, ezzel hiperpolarizálva az ezeket a receptorokat expresszáló neuronokat. Kísérleteink során az mGluR I antagonisták kivédtek az ACEA által kiváltott hiperpolarizációt és az mGluR II blokkolók gátolták a depolarizációt. Az ionotróp glutamát receptor blokkolók nem védtek ki az ACEA a nyugalmi membránpotenciálra gyakorolt hatását, míg a glutamát képes volt neuronális depolarizációt kiváltani thapsigargin jelenlétében. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a CB1 receptoron keresztül megvalósuló asztrocita aktiválás neuronális válaszokat vált ki glutamát felszabadulás révén különböző metabotróp glutamát receptorokon keresztül.

Az eredményeink alapján felállítható legegyszerűbb modellben a neuronokból felszabaduló endokannabinoidok aktiválják az asztrocitákat CB1 receptoron keresztül. Az asztrocitákból glutamát szabadul fel, amely depolarizálja vagy hiperpolarizálja a környező neuronokat aszerint, hogy rajtuk milyen metabotróp glutamát receptorok találhatóak. Ugyanakkor a fent leírt modell túlságosan leegyszerűsítheti a helyzetet, hiszen az asztrociták közismerten expresszálnak különböző mGluR-okat, és az egyes mGluR-ok jelenléte vagy hiánya felelős lehet az asztrociták funkcionális különbségeiért.

Az ACEA-ra adott asztrocita-válasz nagysága és időbeli lefutása eltérőnek bizonyult a depolarizált és hiperpolarizált neuronok közelében. Ez arra utalhat, hogy egyes asztrocitákban különböző mGluR-ok fordulhatnak elő, amelyek a glutamát elhúzódozó felszabadulását és a "glutamát által kiváltott glutamát felszabadulás" jelenségét, a tónusos glutamát felszabadulás csökkenését vagy növekedését, vagy a glutamáttal együtt felszabaduló egyéb gliotranszmitterek felszabadulását idézhetik elő.

Azt is kimutattuk, hogy a megemelkedett endokannabinoid tónus csökkentheti, vagy teljesen meg is szüntetheti az ACEA-ra kialakuló választ mind a neuronokban mind pedig az asztrocitákban. Ugyanakkor más aktivitásfüggő illetve sejttípus-specifikus mechanizmusok is felelősek lehetnek a későbbi jelenségért, mivel az alacsony dózisú ACEA-val történő előinkubáció nem teljesen modellezte a sejtek kontroll körülmények közötti aktivitását és a válasz teljes hiányát, amelyet a nem válaszoló sejtek esetében megfigyelhettünk.

A kolinerg és kannabinoid agonisták hatásainak átfedése a PPN neuronjain

Kísérleteink során azt láttuk, hogy a PPN neuronjai karbakolra (muszkarinos acetilkolin receptor agonista) és ACEA-ra (CB1 receptor agonista) hasonló módon reagálnak. A karbakol hatásához hasonlóan, a PPN neuronjainak válasza ACEA-ra depolarizáció és tüzelési frekvencia emelkedés, hiperpolarizáció és tüzelési frekvencia csökkenés, vagy válaszhiány. Ezeken a sejteken a karbakol depolarizációt váltott ki, az ACEA pedig ugyancsak depolarizációt okozott.

A két neuromodulációs mechanizmus átfedéseire több lehetséges magyarázat létezik. Kimutatták, hogy a karbakol poszt-szinaptikus serkentő hatásait a PPN thalamikus projekciós neuronjaiban az M1 és nACh receptor stimulációja közvetíti. Ismert, hogy a nACh receptor közvetlenül gátolható endokannabinoidokkal, és közvetetten a CB1 vagy CB2 receptorok aktivációjával, ezért a nikotinos receptorok aktivációján keresztül kialakuló depolarizáció mind ACEA, mind karbakol hatására valószínűtlennek tűnik. Az M1 receptor aktivációja a CB1 receptorhoz hasonló jelátviteli útvonalakat aktiválhat, és ez az átfedés magyarázhatja a hasonló hatást. Hasonló átfedés van az M3 és a CB1 receptor jelátviteli útvonalaiban, mivel ezek a receptorok ugyanúgy a rho-kináz és a protein-kináz C aktivációján keresztül fejtik ki hatásukat, amelyet már leírtak musculus ciliarisban.

Az asztrociták CB1 receptorának aktivációja depolarizálta a PPN neuronokat az asztrocitákból történő glutamát-felszabadulás révén, mely feltehetően a neuronokon levő mGluR II-t aktiválja. Az M1 és a mGluR II receptorok aktivációja egy közös jelátviteli útvonalat indíthat el; hasonló konduktanciákat aktiválhatnak vagy gátolhatnak, és ez vezethet ugyanazon neuronok depolarizációjához. Továbbá, Purkinje-sejtekben és hippocampusban is leírták, hogy a muszkarinos acetilkolin receptorok aktivációja fokozhatja az endokannabinoid szintézist. Ha a PPN esetében is létezik hasonló mechanizmus, az M1 receptor aktivációja megnövelheti a kannabinoid szintézist a neuronokon, amely aztán aktiválja környező asztrocitákat, és így a muszkarinos hatás endokannabinoidok közvetítésével is végbemehet.

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

A karbakol hatására bekövetkező hiperpolarizáció nincs teljes átfedésben az ACEA által kiváltott hiperpolarizációval, mivel a karbakolra hiperpolarizálódott sejtek depolarizálódhattak vagy nem válaszoltak ACEA hatására. Összhangban az M1 mediált endokannabinoid felszabadulás elméletével; feltételezhetjük, hogy a karbakol által indukált hiperpolarizáció M2 vagy M4 receptoron valósul meg, és ezen receptorok aktivációja felülírhatja az M1 receptor függő útvonalon, endokannabinoid-felszabaduláson keresztül megvalósuló heterogén választ. Az is elképzelhető továbbá, hogy a másmilyen muszkarinos receptorokat kifejező neuronok eltérő mGluR-okat expresszálnak, és ez állhat a funkcionális különbségek hátterében. Vonzó lehetőség feltételezni, hogy a PPN-ben több neuromodulációs hatásnak van egy közös "asztrocita-komponense", amit a neuronokon közvetlenül érvényesülő hatások mindössze módosítanak. Ennek a feltevésnek a bizonyítása azonban további kísérleteket igényel.

Összefoglalva a fentieket, a fenti munkában azt mutattuk be, hogy a PPN neuronok CB1 receptor stimuláció hatására heterogén módon képesek változtatni membrán potenciál és akcióspotenciál-tüzelési frekvenciájukat. A neuronális membránpotenciál változása az asztrociták CB1 receptorának aktiválása útján, glutamát felszabadulása és mGluR-ok aktivációja révén valósul meg. Ez a közvetett kannabinoid szabályozás úgy tűnik, hogy hatékonyan szabályozza a PPN neuronok működését, és hozzájárul a PPN oszcillációs aktivitásának modulációjához, ami a globális agyi állapotok kialakításában játszik szerepet.

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



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

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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





További Közlemények

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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 11,427

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

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

Debrecen, 2015.09.14.

